

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO
JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM**

MARÍA ANGÉLICA MERA CORDOBA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *in vitro* DOS
EXTRATOS VEGETAIS DE *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R.
M. King & H. Rob, *Miconia ferruginata* DC E *Ageratum fastigiatum*
(Gardn.) R. M. King SOBRE CÉLULAS TUMORAIS JURKAT.**

**DIAMANTINA - MG
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO
JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM**

MARIA ANGELICA MERA CORDOBA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *in vitro* DOS
EXTRATOS VEGETAIS DE *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R,
M. King & H. Rob, *Miconia Ferruginata* DC E *Ageratum fastigiatum*
(Gardn.) R. M. King SOBRE CÉLULAS TUMORAIS JURKAT.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales
do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito
Alvim de Melo

Co-orientadora: Dr^a. Valéria Gomes de Almeida

**DIAMANTINA - MG
2017**

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM

C796a Córdoba, María Angélica Mera.
2017 Avaliação da atividade citotóxica in vitro dos extratos vegetais de *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R. M. King & H. Rob, *Miconia ferruginata* DC e *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King sobre células tumorais Jurkat / María Angélica Mera Córdoba. – Diamantina, 2017.

123 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo
Coorientadora: Profa. Dra. Valéria Gomes de Almeida

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Plantas medicinais. 2. Mecanismos de morte celular. 3. Atividade antitumoral. I. Melo, Gustavo Eustáquio Brito Alvim de. II. Almeida, Valéria Gomes de. III. Título.

CDD 615.321

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG

www.ufvjm.edu.br

prppg@ufvjm.edu.br



ATA DE DEFESA DE MESTRADO DE MARIA ANGELICA MERA CORDOBA ELABORADA PELA COMISSÃO EXAMINADORA.

A Comissão Examinadora da Dissertação de MESTRADO da pós-graduanda MARIA ANGELICA MERA CORDOBA do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Stricto Sensu, nível de MESTRADO, área de concentração: Mestrado em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, instalou-se no dia 15 de Março do ano de 2017, às 09:00, nas dependências da UFVJM, para abertura dos trabalhos e arguição da candidata. A Comissão Examinadora foi composta pelos Professores Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo - Orientador (UFVJM), Prof.^a Dr.^a Helen Rodrigues Martins (UFVJM) e Prof.^a Dr.^a Etel Rocha Vieira (UFVJM). Iniciou-se a sessão com a apresentação dos componentes da Comissão Examinadora e leitura dos artigos 55 a 60 do Capítulo XV do Regulamento Geral dos Cursos de Pós-Graduação Stricto Sensu/UFVJM e passou-se a palavra à candidata para apresentação de sua Dissertação intitulada "**Avaliação da atividade Citotóxica in vitro dos extratos vegetais, *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R. M. King & H. Rob, *Miconia Ferruginata* DC, *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King sobre células Jurkat.**". Após a apresentação oral, a candidata foi arguida pela referida Comissão, obtendo o seguinte resultado:

- ☒ Aprovada sem ressalvas
☐ Aprovada com ressalvas
☐ Reprovada

Em caso de aprovação, a candidata fará jus ao título de MAGISTER SCIENTIAE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, pela UFVJM, após a entrega da versão final da dissertação, com as devidas correções, à Secretaria dos Programas de Pós-Graduação e homologação pelo Conselho de Pesquisa e Pós-Graduação.

DIAMANTINA, 15 de Março do ano de 2017, às 09:00


Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo - UFVJM
Orientador


Prof.ª Dr.ª Helen Rodrigues Martins - UFVJM


Prof.ª Dr.ª Etel Rocha Vieira - UFVJM

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por seu cuidado e amor incondicional em todo momento. Obrigada por fazer realidade suas promessas na minha vida.

A meu anjo do céu, meu pai, meu amor eterno, obrigada por ter me motivado a sair da Colômbia, levo você sempre nos meus pensamentos e nas minhas melhores lembranças.

A meu querido Milton, por me ensinar a lutar apesar das dificuldades, por sua paciência, amor e cuidado, amo você.

A minha querida mãe e minha irmã por seu amor, seu cuidado e seu apoio mesmo a distancia, vocês são meu exemplo de fortaleza e perseverança, amo vocês.

A meu querido Orientador, o Dr Gustavo Brito, pela confiança e a oportunidade que me ofereceu, me sinto privilegiada por ter sido aluna de tão grande mestre, admiro muito você, obrigada pela paciência e os conselhos durante meu trabalho.

A minha Co-orientadora, a Dr^a Valéria, pelo tempo dedicado e ajuda durante meu trabalho.

A Dr^a Agnes Batista, pela ajuda, paciência e dedicação. Obrigada por me oferecer sua amizade.

A Dr^a Andréa Teixeira e a Fundação Oswaldo Cruz pela ajuda na realização dos meus experimentos.

A minha colega Poliana, por sua paciência e seu acompanhamento na realização do meu trabalho. Obrigada por sua amizade.

A meus queridos amigos do laboratório: Marcelo, Camilinha, Karine, Lauane, Mica, Lucas, William, por me oferecer sua confiança e seu carinho. Obrigada pelos momentos de alegria, los quiero mucho !!.

As minhas amigas estrangeiras, obrigada pela amizade e por estar comigo nestes dois anos de formação, adoro vocês.

As minhas amigas Marta Dias e Elenice Honorato, por sua amizade sincera, seus conselhos e companhia foram muito importantes durante este tempo aqui no Brasil.

A família Lemos Meira por ter aberto as portas de sua casa, foi um prazer morar com vocês, obrigada pela ajuda, me senti como se fosse parte de sua família, levo vocês para sempre no meu coração.

À todos professores e colegas do mestrado da UFVJM, pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde (CIPq) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, em Diamantina, MG, por fornecer equipamentos e suporte técnico para experimentos.

Agradeço à equipe de funcionários do Campus JK e do CIPq pelo empenho e pela disposição em ajudar.

Agradeço ao Grupo Coimbra das Universidades Brasileiras (GCUB) e a Organização dos Estados Americanos (OEA) pelo financiamento da bolsa.

*“Ten fé ciega, no en tu capacidad para el
triunfo, sino en el ardor con que lo desees”*

Horacio Quiroga

RESUMO

O Cerrado mineiro possui muitas espécies vegetais utilizadas na medicina popular, dentre elas estão a *Pseudobrickellia brasiliensis*, a *Miconia ferruginata* e *Ageratum fastigiatum*, plantas popularmente usadas como analgésico, cicatrizante e anti-inflamatório. Estudos realizados no Laboratório de Imunologia da UFVJM indicaram que extratos destas plantas possuem efeito inibitório sobre a ativação de linfócitos humanos *in vitro*. Em virtude disso, e com base em relatos populares sobre uma possível ação antitumoral, o objetivo principal deste trabalho foi pesquisar se estes extratos apresentariam ou não efeito citotóxico sobre a linhagem tumoral Jurkat, utilizando-se concentrações não tóxicas, já avaliadas sobre células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC). Uma vez que os extratos vegetais foram diluídos no solvente Dimetilsulfóxido (DMSO), inicialmente investigou-se a concentração máxima de DMSO que não alteraria a viabilidade das células Jurkat após 24, 48 e 72 horas de cultura. O efeito citotóxico dos extratos foi avaliado sobre linfócitos tumorais (Jurkat) e sobre linfócitos humanos de voluntários hígidos pelo método de exclusão com azul de tripan, com exceção das culturas tratadas com *P. brasiliensis*, onde a viabilidade foi avaliada por citometria de fluxo. Também foram calculados os índices de seletividade e percentuais de eficácia dos extratos com relação ao fármaco antineoplásico Paclitaxel. Foi avaliada também a interferência desses extratos sobre as fases do ciclo celular das células Jurkat, bem como os mecanismos de morte envolvidos na ação citotóxica dos extratos. De acordo com os resultados obtidos, o DMSO não apresentou efeito tóxico sobre as células Jurkat na concentração de 1%v/v nos três tempos de incubação, sendo esta a concentração de solvente utilizada em todos os ensaios realizados. Extratos etanólicos das folhas da *P. brasiliensis* (PBf) a 200µg/mL, das partes aéreas da *A. fastigiatum* (Afpa) a 50µg/mL e extratos etanólicos e aquosos da *M. ferruginata* (Mfet, Mfaq) a 125µg/mL mostraram maior toxicidade sobre as células Jurkat principalmente após 72h de tratamento. O tratamento, por 24h, com extrato Afpa 50 µg/mL mostrou ser o mais seletivo e eficaz com relação aos outros extratos. Foi evidenciado em todos os extratos, que nas maiores concentrações, após de 24 horas de tratamento, houve uma inibição na progressão da fase G2M do ciclo celular. O extrato das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum* também produziu uma retenção dessas células na fase G0-G1. Todos os extratos induziram a apoptose as células Jurkat, onde o número de células em apoptose tardio foi predominante em relação aos processos necróticos.

Palavras chaves: *Plantas medicinais, mecanismos de morte celular, atividade antitumoral.*

ABSTRACT

The Cerrado Mineiro has many vegetable species used in folk medicine. Plants like *Pseudobrickellia Brasilensis*, *Miconia ferruginata* and *Ageratum fastigiatum* are widely used as analgesic, healing or anti-inflammatory. Studies carried on the Immunology Laboratory (UFVJM) shown that extracts from these plants has inhibitory effects in the activation of *in-vitro*-cultured human lymphocytes. In this way, and based on folk stories related with their anti-tumor action, the main objective of this work was research about the cytotoxic effect of this plants on Jurkat tumor line-cell cultures, using as first experiment non-toxic extract concentrations previously proved on peripheral blood mononuclear cells (PBCM). Once the vegetable extracts were diluted in dimetil-sulfoxide (DMSO), previously, the maximum DMSO concentration not-altering cell viability was determined after 24, 48 and 72 hours. Cytotoxic effect was studied using the exclusion method with tripam blue on tumor lymphocytes (Jukart) and human lymphocytes, donated by healthy volunteers, except for *P.brasilensis* treated line cells, for which cell viability was studied by flux cytometer. The selectivity index and extracts efficiency percentage were calculated and related with the antineoplastic Paclitaxel drug. The extracts interference on the Jukart cell cycle phases and the cell death mechanisms related with the cytotoxic activity were evaluated. According to the obtained results, DMSO does not show cytotoxic effects on Jukart cells in 1% (v/v) concentration at the three incubation times, being this the solvent concentration used in all the experiments. Ethanol extracts of *P. brasilensis* leaves (PBf) at 200µg / mL, aerial parts of *A. fastigiatum* (Afpa) at 50µg / mL and *M. ferruginata* aqueous and ethanolic extracts (Mfet, Mfaq) at 125µg / mL showed higher Toxicity on Jurkat cells mainly after 72h of treatment. The 24 h treatment with Afpa at 50 µg/mL was the most selective and effective in comparison with the other tested extracts. It was evidenced in all extracts, that at the highest concentrations, after 24 hours of treatment, there was an inhibition in the progression of the G2M phase of the cell cycle. The extract of *Ageratum fastigiatum* aerial parts also produced the G0-G1 phase retention. All extracts induced Jukart cell apoptosis, and cell number on late apoptotic phase predominated on the necrotic ones.

Keywords: Medicinal plants, mechanisms of cell death, antitumor activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Imagens da *Pseudobrickellia brasiliensis*. A - *P. brasiliensis* sem flores; B - *P. brasiliensis* com flores. C – flores de *P. brasiliensis* em destaque. Arquivo pessoal.30

Figura 2-Imagens da *Ageratum fastigiatum*. A e B- estrutura total da planta. C e D inflorescências de corola lilá. Fonte: Avelar-Freitas, B. A., 2013b. 3

Figura 3-Imagens da *Miconia ferruginata*. A –Estrutura total da *Miconia ferruginata*. B-estrutura da planta com flores. C– estrutura das folhas do arbusto. Fonte: http://www.virboga.de/Miconia_ferruginata.htm, 2016..... 38

Figura 4-Imagem da *Catharanthus roseus* e estruturas químicas dos alcaloides da Vinca. A - *Catharanthus roseus* espécie nativa e endêmica de Madagascar. B – Estrutura vimblastina. C – Estrutura vincristina. Fonte: <https://www.plantas-venenosas.org/plantas-venenosas-2/> (2017). 41

Figura 5-Imagem *Taxus brevifolia* e estrutura química do Taxol. A –*Taxus brevifolia*. B – Taxol composto ativo obtido da *T.brevifolia*. Fonte: <http://www.arsenalterapeutico.com/2015/10/19/tejo-taxus-brevifolia/> (2017). 42

Figura 6-Fases do ciclo celular. A- fases do ciclo celular. B- histograma de DNA diploide por citometria de fluxo. Fonte: Elaborado pelo autor..... 48

Figura 7-Esquema ilustrando a distribuição de células marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo, após análise por citometria de fluxo. Fonte: Elaborado pelo autor.49

Figura 8-Estratégia de análise utilizada para avaliar a citotoxicidade de Dimetilsulfóxido sobre células Jurkat. A- Seleção da população de células Jurkat em gráficos de distribuição pontual tamanho (FSC) versus granulosidade celular (SSC). B- Histogramas em função da intensidade fluorescência no canal de Azul de tripan (PerCP-H) no citômetro de fluxo BD FACSCanto II..... 57

Figura 9-Estratégia de análise utilizada para avaliar a citotoxicidade do extrato *P. brasiliensis* sobre células Jurkat ou células mononucleares do sangue periférico. A- Seleção da população celular em gráficos de distribuição pontual tamanho (FSC) versus

granulosidade (SSC). B-Histogramas em função da intensidade de fluorescência no canal de Iodeto de propídeo (PE-H) no citômetro de fluxo BD FACSCanto II..... 59

Figura 10-Estratégia utilizada para avaliação do efeito dos extratos etanólicos *P. brasiliensis*, *M. ferruginata* e *A. fastigiatum* e aquosos da *M. ferruginata* em células Jurkat sobre o ciclo celular após 24h de incubação pela técnica citometria de fluxo. A- Seleção da população morfológicamente semelhante utilizando gráficos de distribuição pontual tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). B-Seleção da população presente em um dos quatro estados interfásicos do ciclo celular através de gráficos de distribuição pontual Iodeto de propídeo (FL3H:PI) versus granulosidade celular (SSC-H). C- Determinação do conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA) nas fases Sub G1, S ou G2M mediante o modelo de Watson com o Software FlowJo v.10.0.7..... 61

Figura 11-Determinação do conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA) nas fases Sub G0-G1 mediante histogramas em função da intensidade de fluorescência no canal de Iodeto de Propídeo no citômetro de fluxo FACScan..... 62

Figura 12-Estratégia utilizada para avaliação da atividade apoptótica e necrótica dos extratos etanólicos *P. brasiliensis*, *M. ferruginata* e *A. fastigiatum* e aquosos da *M. ferruginata* sobre células Jurkat após 24h de incubação celular pela técnica de citometria de fluxo. A- Seleção da população morfológicamente semelhante utilizando gráficos de distribuição pontual tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). B- Análise dos "Dot-plots" mediante gráficos de distribuição pontual Anexina V versus Iodeto de propídeo (PI) para a determinação da porcentagem de população de células viáveis (Q4), células em apoptose inicial (Q3) ou apoptose (Q2) tardia ou necrose (Q1) Dados adquiridos no citômetro de fluxo FACScan. Análise dos dados por meio do software FlowJo, versão 10.0.7..... 64

Figura 13-Percentual de Jurkat viáveis após tratamento com DMSO durante 24, 48 ou 72h (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas são identificadas pelas letras "a", "b", "c" e "d" para as comparações em relação às culturas Controle (CONT), Paclitaxel (PCX) ou 4% v/v e 8% v/v de Dimetilsulfóxido (DMSO) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA one-way com *post hoc* de Tukey..... 67

Figura 14-Percentual de Jurkat ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC) viáveis após tratamento com *P. brasilensis* durante 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * Indica diferença significativa em relação às culturas de células mononucleares do sangue periférico tratadas com extrato ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com post hoc Bonferroni..... 69

Figura 15-Percentual de Jurkat ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC) viáveis após tratamento com *M. ferruginata* durante 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * Indica diferença significativa em relação às culturas de células mononucleares do sangue periférico tratadas com extrato ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Bonferroni..... 71

Figura 16- Percentual de Jurkat ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC) viáveis após tratamento com *M. ferruginata* durante 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * Indica diferença significativa em relação às culturas de células mononucleares do sangue periférico tratadas com extrato ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Bonferroni..... 73

Figura 17-Percentual de Jurkat ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC) viáveis após tratamento com *A. fastigiatum* durante 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * Indica diferença significativa em relação às culturas de células mononucleares do sangue periférico tratadas com extrato ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Bonferroni..... 75

Figura 18-Percentual de Jurkat viáveis tratadas com o extrato etanólico *P. brasilensis* após 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças são identificadas pelas letras “a”, “b” e “c”, para as comparações entre às culturas *P. brasilensis* (0 μ g/mL), Paclitaxel (PCX), *P. brasilensis* (200 μ g/mL) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Tukey..... 79

Figura 19- Percentual de Jurkat viáveis tratadas com o extrato etanólico *M. ferruginata* após 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c”, e “d”, para as comparações entre às culturas *M. ferruginata* (0 μ g/mL), Paclitaxel (PCX), *M. ferruginata* a 31,2 μ g/mL, 62,5 μ g/mL e 125 μ g/mL respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Tukey. 81

Figura 20- Percentual de Jurkat viáveis tratadas com o extrato aquoso *M. ferruginata* após 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c”, ou “d”, para as comparações entre às culturas *M. ferruginata* (0 μ g/mL), Paclitaxel (PCX), *M. ferruginata* a 31,2 μ g/mL, 62,5 μ g/mL e 125 μ g/mL respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Tukey. 83

Figura 21-Percentual de Jurkat viáveis tratadas com o extrato etanólico *A. fastigiatum* após 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c”, “d” ou “e”, para as comparações entre às culturas *A. fastigiatum* (0 μ g/mL), Paclitaxel (PCX), *A. fastigiatum* a 12,5 μ g/mL, 25 μ g/mL e 50 μ g/mL respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Tukey. 85

Figura 22- Percentual de eventos para cada fase do ciclo celular de Jurkat tratadas com extrato etanólico de *P. brasiliensis* (200 μ g/mL) após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças estatísticas são identificadas pelas letras “a”, “b”, “d”, “e”, “f” e “g”, para as comparações nas subfases Sub G0-G1, G0-G1, S e G2M entre as culturas Controle (CONT), Paclitaxel (PCX) e *P. brasiliensis* (200 μ g/mL) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA com *post hoc* Bonferroni. 87

Figura 23- Percentual de eventos para cada fase do ciclo celular de Jurkat tratadas com extrato etanólico de *M. ferruginata* (125 μ g/mL) após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças estatísticas são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f” e “g”, para as comparações nas subfases Sub G0-G1, G0-G1, S e G2M entre as culturas Controle (CONT), Paclitaxel

(PCX) e *M. ferruginata* (125µg/mL) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA com *post hoc* Bonferroni..... 88

Figura 24- Percentual de eventos para cada fase do ciclo celular de Jurkat tratadas com extrato aquoso de *M. ferruginata* (125µg/mL) após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas são identificadas pelas letras “a”, “b”, “d”, “e”, “f”, “h” e “i”, para as comparações nas subfases Sub G0-G1, G0-G1, S e G2M entre as culturas Controle (CONT), Paclitaxel (PCX) e *M. ferruginata* (125µg/mL) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA com *post hoc* Bonferroni..... 89

Figura 25- Percentual de eventos para cada fase do ciclo celular de Jurkat tratadas com extrato etanólico de *A. fastigiatum* (50µg/mL) após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f”, “g”, “h” e “i”, para as comparações nas subfases Sub G0-G1, G0-G1, S e G2M entre as culturas Controle (CONT), Paclitaxel (PCX) e *A. fastigiatum* (50µg/mL) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA com *post hoc* Bonferroni..... 90

Figura 26- Percentual de células Jurkat: viáveis ■ , em necrose □ , em apoptose recente ▒ e tardia □□ em culturas Controle (CONT), tratadas com Paclitaxel (PCX) e extrato *P. brasiliensis* (200µg/mL) após 24h de cultura. (n=4). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferença significativa considerada quando $p \leq 0,05$; ANOVA com *post hoc* de Tukey. 91

Figura 27- Percentual de células Jurkat: viáveis ■ , em necrose □ , em apoptose recente ▒ e tardia □□ em culturas Controle (CONT), tratadas com Paclitaxel (PCX) e extrato etanólico de *M. ferruginata* (125µg/mL) após 24h de cultura. (n=4). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferença significativa considerada quando $p \leq 0,05$; ANOVA com *post hoc* de Tukey.. 92

Figura 28- Percentual de células Jurkat: viáveis ■ , em necrose □ , em apoptose recente ▒ e tardia □□ em culturas Controle (CONT), tratadas com Paclitaxel (PCX) e extrato aquoso de *M. ferruginata* (125µg/mL) após 24h de cultura. (n=4). Os

resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferença significativa considerada quando $p \leq 0,05$; ANOVA com post hoc de Tukey. 93

Figura 29- Percentual de células Jurkat: viáveis ■, em necrose □, em apoptose recente ▒ e tardia □□ em culturas Controle (CONT), tratadas com Paclitaxel (PCX) e extrato *aquoso de A. fastigiatum* (50 μ g/mL) após 24h de cultura. (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferença significativa considerada quando $p \leq 0,05$; ANOVA com post hoc de Tukey. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Posição sistemática da <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>	29
Tabela 2- Posição sistemática da <i>Ageratum fastigiatum</i>	33
Tabela 3- Espécies medicinais da família Melastomataceae no Brasil e seus usos	36
Tabela 4- Posição sistemática da <i>Miconia ferruginata</i>	39
Tabela 5- Plantas vegetais com propriedades antitumorais no mundo.....	43
Tabela 6- Caracterização dos voluntários.....	65
Tabela 7- Valores das concentrações letais e índices de seletividade dos extratos sobre as Jurkat e células PBMC em todos os tempos de incubação.	77
Tabela 8- Valores de eficácia do extrato <i>P. brasiliensis</i> em cada uma das concentrações e tempos de incubação sobre células Jurkat	80
Tabela 9- Valores de eficácia do extrato etanólico <i>M. ferruginata</i> em cada uma das concentrações e tempos de incubação sobre células Jurkat.....	82
Tabela 10- Valores de eficácia do extrato aquoso <i>M. ferruginata</i> em cada uma das concentrações e tempos de incubação sobre células Jurkat.....	84
Tabela 11- Valores de eficácia do extrato aquoso <i>A. fastigiatum</i> em cada uma das concentrações e tempos de incubação sobre células Jurkat.....	86
Tabela 12- Percentuais de células Jurkat viáveis, em necrose, em apoptose recente e tardia, em culturas tratadas com extrato <i>P. brasiliensis</i>	91
Tabela 13- Percentuais de células Jurkat viáveis, em necrose, em apoptose recente e tardia, em culturas tratadas com extrato <i>M. ferruginata</i> etanólico.....	92

Tabela 14- Percentuais de células Jurkat viáveis, em necrose, em apoptose recente e tardia, em culturas tratadas com extrato *M. ferruginata* aquoso. 93

Tabela 15- Percentuais de células Jurkat viáveis, em necrose, em apoptose recente e tardia, em culturas tratadas com extrato *A. fastigiatum*..... 94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% v/v	Porcentagem em volume
µg	Microgramas
µL	Microlitros
A375	Células de melanoma maligno humano
A-431	Células de carcinoma de epidermes
A549	Adenocarcinoma células epiteliais basais alveolares humanas
Afpa	Extrato etanólico das partes aérea da <i>Ageratum fastigiatum</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BrdU	Bromodesoxiuridina
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CAL27	Células tumorais adenoescamosas orais
CdCl ₂	Cloreto de Cadmio
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CIPq-Saúde	Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos
CLAE-DAD-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos acoplado à espectrometria de massas
CLT	Concentração letal teórica
CONT	Grupo controle
DAD	Detector por Arranjo de Diodo
DLD-1	Células de adenocarcinoma colorrectal
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

FSC-A	<i>Forward Side Scatter Área</i>
G0-G1	Fase de pre-síntese de DNA no ciclo celular
G2M	Fase pós-sintética, é o intervalo entre a duplicação do DNA e início da divisão celular, <u>mitose</u>
H-4IIE	Células de hepatoma de rata
HCl	Acido clorídrico
HCT-116	Células de carcinoma colorrectal
Hep-G2	Células de carcinoma hepático
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HL60	Células de leucemia promielocítica humana
Hoechst	Corante fluorescente utilizado para coração do DNA
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IFN- γ	Interferon gamma
IL-2	Interleucina 2
IS	Índice de seletividade
K-562	Células de leucemia mielóide crônica
LC ₅₀	Concentração letal que mata o 50% de uma população em teste
LNCap	Células de adenocarcinoma de próstata
M4Beu	Células cancerígenas de melanoma
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana
MDA-1986	Células de carcinoma escamosas de cavidade oral
MDA-231	Células de adenocarcinoma de mama
Mfaq	Extrato aquoso dos caules da <i>Miconia ferruginata</i>
Mfet	Extrato etanólico dos caules da <i>Miconia ferruginata</i>
MGC-803	Células câncer gástrico
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

NCI	Instituto Nacional do Câncer
NEPRONAT	Laboratório do Núcleo de Estudos de Produtos Naturais da UFVJM
nM	Nanomolar
OMS	Organização mundial da Saúde
PBf	Extrato etanólico das folhas da <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano
PBS	Tampão Fosfato Salina
PC-3	Células de câncer de próstata
PCX	Paclitaxel
PE-H	Ficoeritrina altura
PerCP-H	<i>Proteína Clorofila Piridina Altura</i>
PI	Iodeto de Propídeo
PMA	Miristato Acetato de Forbol
S	Fase de síntese e replicação de DNA no ciclo celular
SFB	Soro Fetal Bovino
SHF	Solução hipotônica fluorescente
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SRB	2-(3-diethylamino-6-diethylazaniumylidene-xanthen-9-yl)-5-sulfo-benzenesulfonate
SSC-A	<i>Side light scatter Area</i>
SSC-H	<i>Side light scatter Altura</i>
Sub G0-G1	Estágio quiescente do ciclo celular
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alpha
Tu159	Células de carcinoma escamosas de cavidade oral
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
VCR	Vincristina
VLB	Vinblastina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 Plantas medicinais	26
3.2 A família Asteraceae	28
3.2.1 <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>	29
3.2.2 <i>Ageratum fastigiatum</i>	32
3.3 A Família Melastomataceae	35
3.3.1 <i>Miconia ferruginata</i>	37
3.4 Propriedades antitumorais em plantas	40
3.5. Avaliação da ação antitumoral de fitoterápicos, <i>in vitro</i>	45
4. METODOLOGIA.....	50
4.1.1 <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>	50
4.1.2 <i>Miconia ferruginata</i>	51
4.1.3 <i>Ageratum Fastigiatum</i>	52
4.2 Critérios de inclusão e sujeitos da pesquisa	53
4.3 Amostras biológicas	54
4.4 Parâmetros hematológicos.....	54
4.5 Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) Humano..	54
4.6 Células da linhagem contínua Jurkat	55
4.6.1 Descongelamento e manutenção de células de linhagem contínua Jurkat	55
4.7 Avaliação da citotoxicidade do solvente DMSO sobre células Jurkat	56
4.8 Avaliação da citotoxicidade dos extratos vegetais sobre células Jurkat e PBMC	58
4.9 Avaliação da atividade biológica do extrato vegetal sobre o ciclo celular de Células Jurkat	60

4.9 Avaliação de eventos apoptóticos e necróticos em células Jurkat tratadas com extratos vegetais	62
4.10 Análises estatísticas	64
5 RESULTADOS	65
5.1. Análise dos hemogramas dos sujeitos da pesquisa.....	65
5.2. Análise <i>in vitro</i> do efeito citotóxico de DMSO sobre células Jurkat após 24h, 48h e 72h de tratamento.....	65
5.3. Comparação do efeito citotóxico dos extratos PBf, Mfet, Mfaq e Afpa entre PMBC e células Jurkat após 24h, 48h e 72h de tratamento	68
5.3.1 Extrato etanólico <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> (folhas).....	68
5.3.2 Extrato etanólico <i>Miconia ferruginata</i> (caule).....	70
5.3.3 Extrato aquoso <i>Miconia ferruginata</i> (caule)	72
5.3.4 Extrato etanólico <i>Ageratum fastigiatum</i> (partes aéreas).....	74
5.4 Obtenção dos índices de seletividade dos extratos a partir dos valores de LC ₅₀ de Jurkat e PBMC, e cálculo das porcentagens de erro entre os índices de toxicidade teórico e experimental dos extratos sobre células Jurkat.....	76
5.5 Análise da eficácia dos extratos PBf, Mfet, Mfaq e Afpa na morte seletiva de células Jurkat após 24h, 48h e 72h de tratamento, quando comparado ao fármaco antitumoral Paclitaxel	77
5.5.1 Extrato etanólico <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> (folhas).....	78
5.5.2 Extrato etanólico <i>Miconia ferruginata</i> (caule)	80
5.5.3 Extrato aquoso <i>Miconia ferruginata</i> (caule)	82
5.5.4 Extrato etanólico <i>Ageratum fastigiatum</i> (partes aéreas).....	84
5.6 Efeito do tratamento com os extratos PBf, Mfet, Mfaq e Afpa sobre o ciclo celular em Células Jurkat.....	86
5.6.1 Extrato etanólico <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> (folhas).....	87
5.6.2 Extrato etanólico <i>Miconia ferruginata</i> (caule)	87
5.6.3 Extrato aquoso <i>Miconia ferruginata</i> (caule)	88
5.6.4 Extrato etanólico <i>Ageratum fastigiatum</i> (partes aéreas).....	89
5.7 Análise da atividade apoptótica e necrótica dos extratos sobre células Jurkat por citometria de fluxo utilizando os marcadores Anexina-V e PI.....	90
5.7.1 Extrato etanólico <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> (folhas).....	91
5.7.2 Extrato etanólico <i>Miconia ferruginata</i> (caule)	92

5.7.3 Extrato aquoso <i>Miconia ferruginata</i> (caule)	93
5.7.4 Extrato etanólico <i>Ageratum fastigiatum</i> (partes aéreas).....	94
6 DISCUSSÃO	95
7 CONCLUSÃO.....	104
8 BIBLIOGRAFIA	105
ANEXO A- Autorização de acesso ao patrimônio genético	117
ANEXO B- Autorização para coleta do material botânico <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>	118
ANEXO C- Autorização para coleta do material botânico <i>Miconia ferruginata</i>	119
ANEXO D- Autorização para coleta do material botânico <i>Ageratum fastigiatum</i>	120
ANEXO E- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	121
ANEXO F- Comprovante de registro no CEP	123

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido usadas para o tratamento de doenças desde a antiguidade. Estudos descrevem como o uso e a eficácia das plantas contribuíram significativamente na divulgação de possíveis propriedades terapêuticas e descobrimento de moléculas com importantes atividades biológicas (MAM, 2002).

Em todo o mundo, principalmente nos países de América do Sul, as plantas medicinais cumprem um papel importante na atenção primária à saúde, sendo em torno de 10% dessas plantas, usadas como alimentos tanto para humanos como para animais. (COWAN, 1999)

O Brasil possui grande parte da diversidade de plantas no mundo, apresentando mais de 20% do número total de espécies registradas. (VENOM, 2010). Muitas delas se encontram na região do Cerrado mineiro, que reúne mais de 10.400 plantas, utilizadas geralmente pela população com a finalidade terapêutica ou profilática. (REBECA et al., 2002; BOONCLARM et al., 2006; SILVA et al., 2009)

Algumas plantas do Cerrado mineiro já vêm sendo estudadas por alguns pesquisadores, contudo, devido à grande diversidade desse bioma, ainda é necessária a exploração de várias outras que possuam substâncias com potencial farmacológico.

Estudos realizados no laboratório de imunologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri apontam que os extratos de *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Miconia ferruginata* e *Ageratum fastigiatum*, plantas popularmente utilizadas na região, apresentam atividade anti-inflamatória, conforme indagado pela população local, uma vez que interferem nas funções biológicas dos linfócitos, células-chaves na manutenção da resposta inflamatória, principalmente crônica (ALMEIDA, 2012, 2015; AVELAR, 2013; RIBEIRO, 2015; COSTA, 2016; SANTOS, 2016). Estas plantas, também são mencionadas pela medicina popular como plantas com ação antitumoral, entretanto nenhum estudo até o momento foi realizado para avaliar tal atividade. Diante disso, no presente trabalho, decidimos avaliar o potencial antitumoral dessas plantas, no contexto *in vitro*, usando extratos etanólicos das folhas da *P.*

brasiliensis (PBf), das partes aéreas da *A. fastigiatum* (Afp) e extratos etanólicos e aquosos da *M. ferruginata* (Mfet, Mfaq) avaliando seu efeito citotóxico sobre a linhagem tumoral Jurkat (células provenientes de linfomas de células T).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial antitumoral *in vitro* dos extratos vegetais de *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Miconia ferruginata* e *Ageratum fastigiatum* sobre células Jurkat.

2.2 Objetivos específicos

- Fazer uma triagem do efeito citotóxico dos extratos etanólicos PBf, Mfet, e Afpa, e aquoso Mfaq sobre células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC).
- Fazer uma triagem do efeito citotóxico dos extratos etanólicos dos extratos etanólicos PBf, Mfet, e Afpa, e aquoso Mfaq sobre células tumorais Jurkat.
- Determinar LC_{50} dos extratos vegetais sobre células Jurkat e PBMC em diferentes tempos de incubação (24h, 48h e 72h) e calcular os índices de seletividade.
- Calcular a eficácia dos extratos com relação ao fármaco padrão Paclitaxel para todos os tempos de incubação (24h, 48h e 72h).
- Avaliar o efeito do tratamento dos extratos acima relatados sobre as fases do ciclo celular das células Jurkat.
- Avaliar os mecanismos de morte celular (se por apoptose ou necrose) após tratamento dos extratos vegetais, na concentração mais eficiente, conforme testado na triagem proposta.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas medicinais

Desde tempos pré-históricos o homem tem utilizado as plantas para fins medicinais (curativos e preventivos), alimentícios e cosméticos. O uso etnofarmacológico de plantas medicinais aponta espécies promissoras como fontes de informação para o descobrimento de possíveis substâncias com atividade biológica. (MONACHE, 1997).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), de 70 a 90% da população dependem das plantas como única alternativa acessível para os cuidados básicos de saúde, o que as colocam como um relevante instrumento alternativo na assistência farmacêutica (WHO, 2011).

Durante muitos anos, vários procedimentos clínicos tradicionais se basearam na utilização de plantas e mesmo após a evolução da alopatia, a partir da segunda metade do século XX, as dificuldades da população em relação de acesso aos centros médicos e à medicamentos de alto custo, contribuíram de maneira considerável para a continuidade do uso de espécies vegetais com propriedades terapêuticas (VEIGA JÚNIOR, PINTO e MACIEL, 2005)

A inserção de plantas medicinais na rede de saúde A inserção de plantas medicinais na rede de saúde requer estudos científicos que comprovem seu uso popular e avaliem a existência de possíveis efeitos adversos e tóxicos, além de maior, além de maior entendimento quanto à sua ação terapêutica, a forma correta de preparo e em quais casos a planta poderia ser indicada (SCHENKEL, 1991; BRUNING, 2012). Isso motiva aos pesquisadores a desenvolverem trabalhos sugerindo o uso correto de determinadas plantas, ainda que a elucidação de todos mecanismos de ação dos componentes ativos não seja alcançada, o que continua sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia (GUIZARDI, 2008; CALIXTO, 2000a).

Existem três métodos já estabelecidos na busca de novos produtos vegetais: A prospecção aleatória, baseada no estudo de plantas que têm sido selecionadas

aleatoriamente pelos membros de uma população; a etnobotânica, que usa o conhecimento da medicina tradicional para fazer a seleção de plantas e posteriormente realizar ensaios de bioprospecção; e o método de observação Ecológica, em que se obtém pistas informais das plantas com possível atividade biológica, baseadas nos efeitos observados em espécies animais que, de alguma forma, interagem com determinadas plantas, ingerindo-as ou apenas mantendo contato com as mesmas. Uma variação desta categoria é a Zoofarmacognosia, na qual se selecionam aquelas plantas que são ingeridas com mais frequência pelos animais (primatas), para combater dores e infecções (BASSO et al., 2005).

Entre estes três, o método de prospecção aleatória é o mais laborioso e com menor sucesso, contudo cabe destacá-lo, uma vez que diversos fármacos relevantes no tratamento de determinadas doenças foram descobertos por este enfoque, tal como o Taxol® (Paclitaxel), anticancerígeno obtido da planta *Taxus brevifolia* (VEGA, 2006; MAMEDOV, 2012). Por outro lado, o método Etnobotânico, tem fornecido melhores resultados em comparação ao método aleatório, uma vez que, a experiência acumulada ao longo do tempo, acaba por promover naturalmente a realização de “ensaios clínicos” controlados, que de alguma forma são úteis durante o processo de obtenção de um fármaco para uso humano (LEWIS, 1995)

Nas últimas décadas, as pesquisas de caráter Etnobotânico têm aumentado em vários países, principalmente em países da América latina, como Brasil, Colômbia e México (HAMILTON et al., 2003). Contudo, o Brasil, ao possuir a maior diversidade biológica do mundo, vem despertando grande interesse pelas comunidades científicas internacionais, para o estudo, conservação e utilização racional destes recursos.

Muitas dessas plantas estão presentes na região do Cerrado, Um bioma caracterizado pela presença de plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, que somam mais de 7.000 espécies. Tal diversidade se deve às continuas variações nos padrões evolutivos, assim como também pelas mudanças paleoclimáticas e intercâmbios de elementos florísticos com formações vegetais circundantes (MENDONÇA et al., 1998). Uma boa parte do território de Minas Gerais faz parte do Bioma do Cerrado, com destaque para as sub-regiões que abarcam as regiões do Alto e Médio Jequitinhonha, Alto e Médio São Francisco, Campo das Vertentes, Zona

Metalúrgica, Triângulo e Alto Paranaíba. Relatos populares descrevem que tais zonas possuem plantas que têm sido utilizadas pela medicina tradicional como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e antifúngicos, dentre outras atividades. No entanto pela amplitude deste bioma, ainda carecem estudos científicos que suportem os ditos efeitos terapêuticos dos extratos brutos, ou compostos isolados, provenientes destas plantas (VIERA, 2000; DOMINGUES, 2006).

3.2 A família Asteraceae

As Asteraceae constituem a maior parte da superfamília das Angiospermas, com mais de 1.620 gêneros e 23.600 espécies (STEVENS, 2016). Estima-se que aproximadamente 250 gêneros e 2.000 espécies, estão distribuídos em território brasileiro, principalmente na região do Cerrado (HIND, 1993; PEREIRA, 2001; SOUZA; LORENZI, 2008). Nos últimos 25 anos, no Brasil, as Asteraceae vêm sendo intensamente estudadas, não somente quanto à sua morfologia, anatomia, ontogenia, citogenética, ecologia e fitoquímica, como também, quanto à sua estrutura macromolecular (HOLMES, 1996). Estes estudos começaram com o trabalho de Baker (1873; 1876; 1882; 1884), no entanto, Barroso e colaboradores (1986) foram os primeiros a informar sobre a distribuição das tribos e gêneros das Asteraceae existentes no Brasil (BARROSO et al., 1986). A partir de então foram feitos novos levantamentos para cada um dos estados e localidades. (NAKAJIMA, 2000).

As Asteraceae caracterizam por serem ervas subarbustos, arbustos, pequenas árvores ou lianas, com folhas alternas ou opostas, raramente verticiladas, simples, de margem inteira ou serrada (SOUZA; LORENZI, 2008). Do ponto de vista econômico, no Brasil, mais de 40 espécies são usadas diretamente na alimentação humana, como alface e chicória e de forma indireta na fabricação de produtos, como girassol, camomila e carqueja. Conhece-se ainda espécies silvestres com potencial nutricional, também usadas para aplicações tecnológicas, ornamentais e mesmo industriais. (VITTO; PETENATTI, 2009).

Muitas plantas pertencentes a essa família tem sido usadas pela medicina tradicional como: anti-inflamatórios, antimicrobianos e analgésicos. Porém estudos científicos têm mostrado que estas plantas também apresentam compostos químicos com potencial atividade antitumoral (LORENZI; MATOS, 2002; HOWARD et al.,

2003). Nos anos 2003 e 2005 foram estudados os extratos etanólicos das folhas das Asteraceae: *Vernonia amygdalinae* *Vernonia pachyclada*, verificando-se na *V. amygdalina* uma atividade anti-proliferativa, por inibição da síntese de DNA, em células tumorais MCF-7 (câncer de mama) (HOWARD et al., 2003) e o extrato da *V. pachyclada* apresentou citotoxicidade frente à linhagem de câncer de ovário humano A2780 (WILLIAMS et al., 2005). Tais propriedades se atribuem a estas plantas devido à presença de compostos químicos principalmente flavonóides, compostos ativos caracterizados por produzir esse tipo de ação (ARAÚJO et al., 2008).

3.2.1 *Pseudobrickellia brasiliensis*

A *Pseudobrickellia brasiliensis*, também conhecida como "Arnica do campo" ou "árnica do mato" é uma espécie de arbusto ou subarbusto pertencente à tribo Eupatorieae e à família das Asteraceae. A *P. brasiliensis* é uma planta endêmica do Brasil, presente em Campo Rupestre e Cerrado, especificamente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Pernambuco e Bahia (ALMEIDA et al., 2004; FORZZA et al., 2010). A sistemática da *P. brasiliensis* esta indicada na Tabela 1:

Tabela 1- Posição sistemática da *Pseudobrickellia brasiliensis*

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Asterales
Família	Asteraceae
Tribo	Eupatorieae
Gênero	<i>Pseudobrickellia</i>
Espécie	<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>

P. brasiliensis trata-se de um subarbusto de aproximadamente 1,3m de altura, com ramos cilíndricos, folhas simples, alternadas, densamente espiraladas de limbo linear e flores monoclinas, de corola tubulosa, na cor creme como se apresenta na Figura 1:

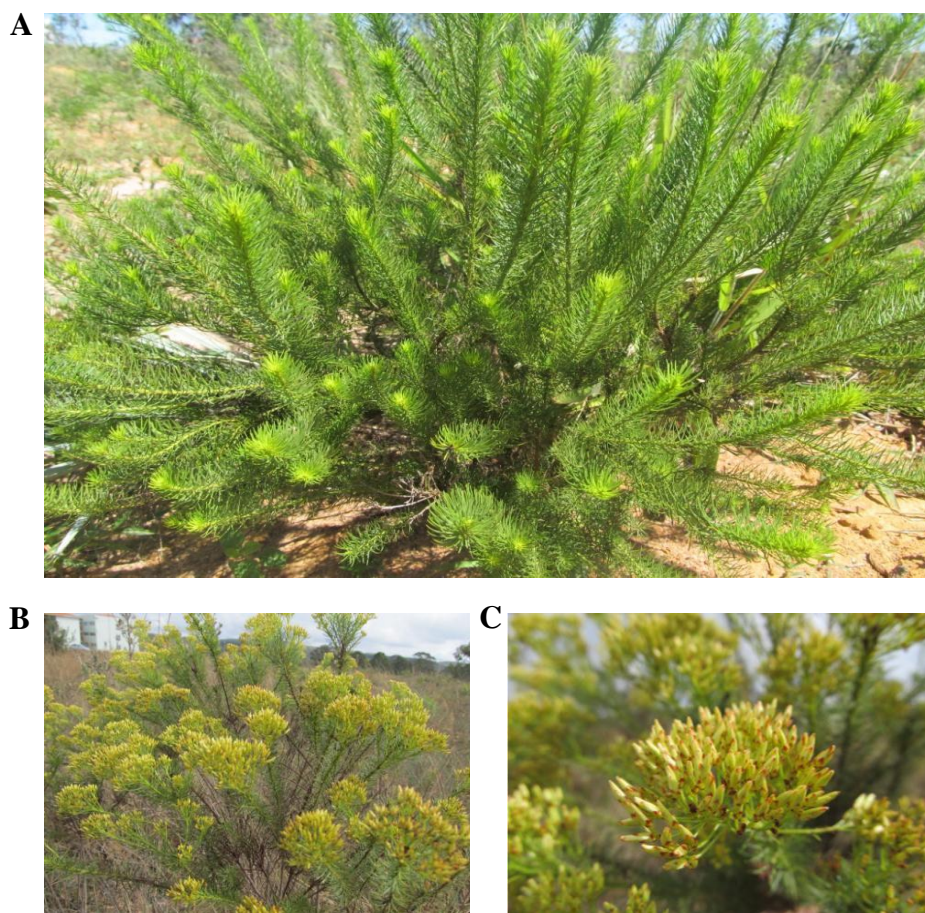


Figura 1-Imagens da *Pseudobrickellia brasiliensis*. A - *P. brasiliensis* sem flores; B - *P. brasiliensis* com flores. C – flores de *P. brasiliensis* em destaque (ALMEIDA, 2015).

Segundo relatos populares, macerados alcoólicos da planta inteira têm sido utilizados como analgésico, anti-inflamatório e cicatrizante (RIBEIRO et al., 2001; SILVA et al., 2015). Porém existem poucos estudos científicos com relação a esta espécie. O primeiro estudo fitoquímico reportado ocorreu em 1984, onde se encontrou a presença de germacreno-D, lupeol, acetato de β -amirina, espatulenol, cadineno, cadinol, oplopanona a partir do extrato etéreo das partes aéreas dessa planta. Nesse mesmo estudo foram também identificados sesquiterpenos alcoólicos extraídos das partes aéreas usando uma mistura de éter etílico e éter de petróleo 1:2 (BOHLMANN et al., 1984).

Tavares (2012) realizou um estudo com cinco plantas do Cerrado, dentre elas a *Pseudobrickellia brasiliensis*, onde foi avaliada a atividade inseticida, encontrando-se uma alta redução dos insetos *Coleomegilla maculata*, *Cycloneda sanguinea* e *Eriopsis connexa* após aplicação dos extratos vegetais, concluindo-se que o extrato da

P.brasilensis também se apresenta como uma planta promissora no controle de pragas (TAVARES, 2012).

Uma triagem fitoquímica realizada em caules, flores e folhas da *P.brasilensis* (ALMEIDA, 2015), mediante reações cromogênicas, fluorogênicas e de precipitação, indicou a presença de saponinas, terpenos, taninos e flavonóides. Neste mesmo estudo foi verificada a presença de flavonóides nos extratos etanólicos das partes aéreas, utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), principalmente do grupo das flavonas e flavonóis. Além disso, foi possível também a identificação de 49 compostos, 22 presentes no óleo essencial das flores e 27 no óleo das folhas, destacando-se os compostos majoritários β -pineno, limoneno, α -pineno, sabineno, óxido de cariofileno e E-cariofileno. Silva e colaboradores também realizaram uma investigação sobre os óleos essenciais de *P. brasilensis*, em amostras coletadas na região de Araçuaí no estado de Minas Gerais e identificaram diversos monoterpenos sendo os principais: Terpinen-4-ol, γ -terpineno, α -terpineno, e α -terpineol (SILVA et al., 2015).

Em relação às atividades biológicas da *P.brasilensis*, foi verificada uma ação anti-inflamatória, mediante estudo realizado com extratos brutos das folhas da planta. Os extratos etanólicos e acetato de etila mostraram alto grau de toxicidade sobre células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), e por esta razão foram excluídos das análises posteriores relacionadas com a avaliação do perfil de produção de citocinas e proliferação. No entanto, o extrato aquoso, não apresentou ação tóxica sobre PBMC, mesmo após cinco dias de cultura. O tratamento sobre PBMC, *in vitro*, com esse extrato reduziu a expressão de IFN- γ e TNF- α após estimulação inespecífica com o mitógeno Miristato Acetado de Forbol (PMA) e ionomicina. O efeito inibitório deste extrato, também foi observado por meio da diminuição da proliferação de linfócitos tratados com o extrato na presença do mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Tais achados contribuíram para sugerir que o efeito anti-inflamatório atribuído à *P. brasiliensis* pela medicina popular, se devem, pelo menos em parte, à inibição da ativação e proliferação de linfócitos, bem como da produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas por essa população celular (ALMEIDA, 2012).

Em trabalho subsequente realizou-se um estudo para avaliar o efeito de sub-frações de partes aéreas da *P.brasiliensis* (caule, folhas e flores) sobre parâmetros inflamatórios, *in vitro*. O tratamento com o extrato etanólico de folhas de *P. brasiliensis* inibiu a expressão das citocinas TNF- α e IL-2, avaliadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), além da expressão de IFN- γ , em linfócitos humanos estimulados com PMA e ionomicina. A partir dele, foram então obtidas frações *den*-hexano, diclorometano, acetato de etila, e, aquosa, cuja utilização em culturas inibiu a expressão da citocina TNF- α , a partição hexânica levou também a inibição da expressão da IL-2 e do IFN- γ (ALMEIDA, 2015).

Baseados nas informações anteriores sobre a composição química e o potencial anti-inflamatório e anti-proliferativo desta planta, aliado a relatos etnobotânicos sobre uma possível ação anti-tumoral da planta, indagamos se o extrato etanólico das folhas de *P.brasiliensis* apresentaria, nas concentrações não tóxicas já avaliadas em estudos anteriores, citotoxicidade seletiva sobre linhagens tumorais de linfócitos T (Jurkat).

3.2.2 *Ageratum fastigiatum*

A *Ageratum fastigiatum*, pertence à tribo Eupatoriae e à família Asteraceae. É uma planta tropical distribuída na região Sudeste do Brasil, principalmente em Minas Gerais (GUIMARÃES et al., 2002; ALMEIDA et al., 2004). No Vale do Jequitinhonha, em especial na região de Diamantina – Minas Gerais, a planta é conhecida popularmente como "matapasto" ou "enxota". A sistemática da *A. fastigiatum* esta indicada na Tabela 2:

Tabela 2- Posição sistemática da *Ageratum fastigiatum*

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Asterales
Família	Asteraceae
Tribo	Eupatorieae
Gênero	<i>Ageratum</i>
Espécie	<i>Ageratum fastigiatum</i>

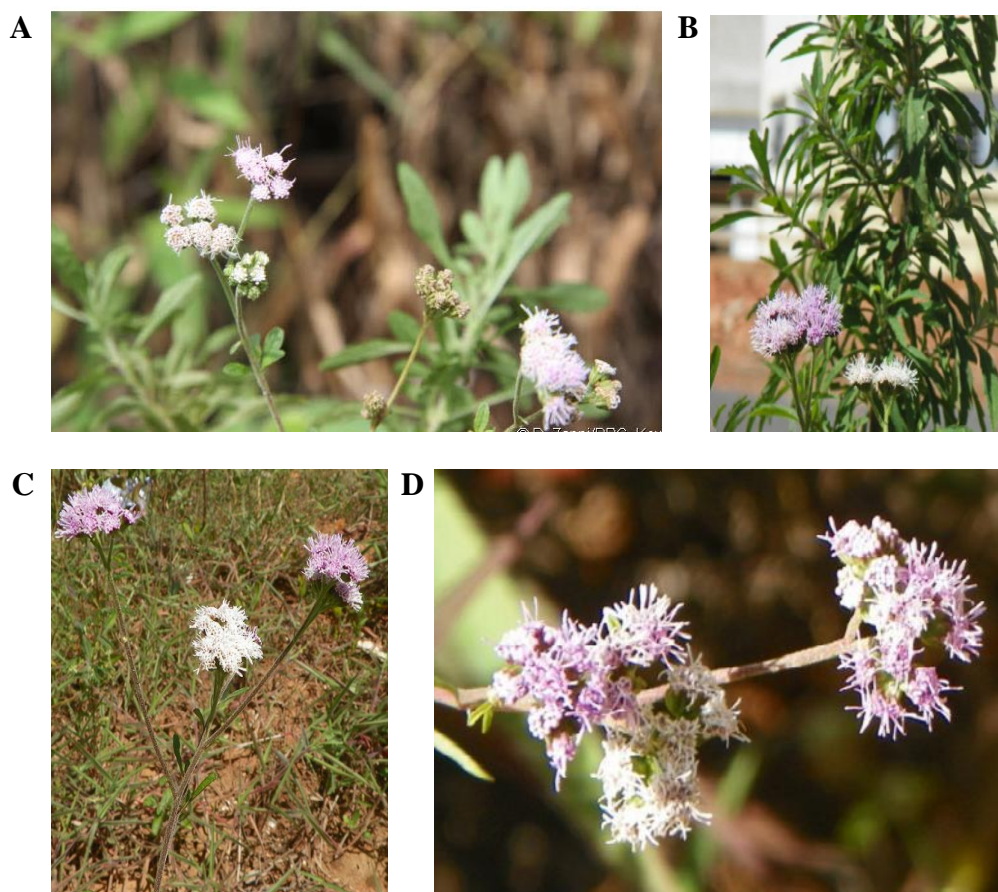


Figura 2-Imagens da *Ageratum fastigiatum*. A e B- estrutura total da planta. C e D- inflorescências de corola lilá. Fonte: Avelar-Freitas, B. A., 2013b.

Estudos fitoquímicos feitos em 1981 e 1983 por Bolhmann e colaboradores mostraram que a planta *A. fastigiatum* coletada no estado de Goiás, mostrou na sua

estrutura a presença de metabólitos secundários como: diterpenos, triterpenos, esteróides, cumarinas e derivados, sendo esta a primeira pesquisa dos constituintes químicos da *A. fastigiatum* (BOHLMANN et al., 1981, 1983). Del-Vechio-Vieira e colaboradores (2009b) realizaram uma avaliação sobre a composição química do óleo essencial da *A. fastigiatum* coletada no município de São João Del Rei – MG e identificou, como constituintes principais: O germacreno D, α -humuleno e β -cedreno (DEL-VECHIO-VIEIRA et al., 2009b). Em outro estudo realizado por estes pesquisadores, analisando o mesmo material vegetal, o óleo essencial das folhas da planta, apresentou como compostos químicos principais: o germacreno-D, o β -cariofileno e o 1,10-di-epi-cubeno. Já no óleo da raiz foi encontrado, maior percentual dos compostos: β -cariofileno, α -humuleno, germacreno-D, 1,10-di-epi-cubenol e o óxido de cariofileno (DEL-VECHIO-VIEIRA et al., 2009a).

Avelar e colaboradores (2013b) identificaram no óleo essencial das partes aéreas de *A. fastigiatum*, coletadas, no município de Diamantina-MG, 26 compostos, sendo 11 monoterpenos e 15 sesquiterpenos, sendo os compostos majoritários: o α -pineno, limoneno, trans-cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno, humuleno 1,2-epóxido, 1,6-humuladien-3-ol e α -cadinol (AVELAR-FREITAS et al., 2013b). Em estudos mais recentes foram identificados compostos químicos de uma fração obtida do extrato etanólico das partes aéreas da *A. fastigiatum* identificando-se flavonóis das classes: 7-metil-quercetina e a Rhamnocitrina, moléculas descritas por primeira vez com relação a estudos fitoquímicos da planta (COSTA, 2016).

Com relação à atividade biológica da *A. fastigiatum*, Del-Vechio-Vieira (2007) relata que as frações hexânica e diclorometânica, obtidas a partir do extrato metanólico da planta, apresentaram atividade antimicrobiana e antinociceptiva em modelos animais. As propriedades antimicrobianas foram evidenciadas frente a vários tipos de microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus typhosa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Além disso, o extrato etanólico e suas frações apresentaram propriedades antinociceptivas em ratos, sobre o sistema nervoso periférico e central evidenciado pelos efeitos inibitórios das contrações abdominais e os tempos de lambida da pata (DEL-VECHIO-VIEIRA et al., 2007). O mesmo grupo de pesquisa realizou outra investigação com o óleo essencial das folhas da referida planta, avaliando o efeito antiedematogênico em modelos animais

de inflamação aguda, evidenciando-se uma diminuição do volume do exsudato e da migração leucocitária na região pleural. Resultados que estão relacionados com as propriedades analgésicas e anti-inflamatórias atribuídas à planta pela medicina popular (DEL-VECHIO-VIEIRA et al., 2009b).

Estudos realizados por Oliveira (2016) mostraram que os extratos das partes aéreas da *A. fastigiatum* possuem atividade antitumoral sobre a linhagem tumoral MDA-231. Com base neste último estudo se pesquisou se o extrato apresentaria ou não esta atividade sobre a linhagem tumoral Jurkat (OLIVEIRA, 2016)

3.3 A Família Melastomataceae

A Melastomataceae é uma família representada por mais de 4.500 espécies distribuídas em 11 tribos e 185 gêneros (RENNER, 1993; RENNER et al., 2015), a maior parte das espécies dessa família está localizada em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre. Na flora brasileira, a Melastomataceae é a família mais rica das famílias das angiospermas, com 68 gêneros e mais de 1.500 espécies, que se distribuem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, e ocupa um lugar importante em termos de endemismo com 408 espécies, dentre as quais os gêneros *Miconia Ruiz & Pav*, *Leandra Raddi* e *Tibouchina Aubl* são os mais representativos e estão situadas no Bosque Atlântico (ROMERO, 2002; FORZZA et al., 2010; BAUMGRATZ et al., 2016).

A família das Melastomataceae encontra-se bem representada nas formações rupestres do Brasil e são facilmente reconhecidas por apresentar características como: folhas decussadas com inervação acródroma, estames geralmente falciformes e anteras poricidas ornamentais. Além disso, estas plantas caracterizam-se por possuir um grande potencial para a arborização de parques e jardins, sendo útil para reflorestamento, recuperação ambiental e arborização urbana. Sabe-se também que a madeira destas espécies é bastante usada para postes, cercas, dormentes, carvão, lenha e extração de celulose de fibra curta e os frutos são importantes para a avifauna local (CARVALHO, 1994; BACKES & IRGANG, 2002).

As propriedades químicas e medicinais da família Melastomataceae têm sido pouco estudada. Segundo relatos da medicina popular, muitas das espécies são

utilizadas em casos de verminose, úlcera, escabiose, dispepsia e hipertensão. (STALCUP, 2000).

Na Tabela 3 estão descritas algumas das espécies medicinais da família Melastomataceae no Brasil e seus usos:

Tabela 3- Espécies medicinais da família Melastomataceae no Brasil e seus usos

Espécies	Nome vulgar	Partes	Usos	Fontes
<i>Aciotis longifolia</i> Tr.	Vinagre-do-mato	Folhas	Erisipela	Amorozo, 1997
<i>Bellucia grossularioides</i> (L.) Tr.	Araçá-de-anta, muuba	Folhas, Frutos	Leucorréia, vermes intestinais.	Mors et al., 2000
<i>Clidemia blepharoides</i> DC.	Anhangá-piri, aninga-piri, aninga-pari	Folhas	Ulcerações	Mors et al., 2000
<i>Clidemia hirta</i> (L.) G. Don	Pixirica	Folhas, frutos	Palpitações, flores, males dos rins, frutos bexiga, leucorréia.	Piva, 2002
<i>Leandra lacunosa</i> Cogn	Aperta-ruão	Folhas	Adstringente	Mors et al., 2000
<i>Macairea radula</i> (Bonpl.) DC	Capuchinha	Folhas	Escabiose, dermatoses	Mors et al., 2000
<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Tr	Canela-de-velha, lacre-branco, Maria branca	Folhas	Eupéptico, reumatismo	Albuquerque Mello, 1971; Mors et al., 2000; Vieira & Martins, 2000; Stalcup, 2000
<i>Miconia cinnamomifolia</i> (DC.) Naudin	Mexerico	Folhas	Resfriado, febre	Boscolo, 2003

<i>Mouriri guianensis</i> <i>Aubl.</i>	Cruili, cioula, muriri, murta, murta-de-parida	Folhas,cascas	Ulcerações, Banhos pós-parto, infecções vaginais.	Berg, 1993; Mors et al., 2000
<i>Nepsera aquatica</i> <i>Naud.</i>	Barba-de-paca	Folhas	Hematúria	Mors et al., 2000
<i>Tibouchina aspera</i> <i>Aubl</i>	Margarita	Folhas, flores	Sedativa, béquica	Mors et al., 2000
<i>Tibouchina clavata</i> <i>(Pers.) Wurdack</i>	Orelha-de-gato, orelha-de-onça, pracajá-nambi.	Folhas	Dores de garganta	Mors et al., 2000. Amorozo, 2002
<i>Tibouchina</i> <i>semidecandra F.</i>	Quaresmeira, orelha-de-onça.	Folhas	Dores de cabeça,cicatrizante.	Piva, 2002
<i>Tibouchina urvilleana</i> <i>(DC.) Cogn</i>	Buscopan	Folhas	Dores em geral	Marodin et al., 2001

Fonte: (MELLO, 2004)

3.3.1 *Miconia ferruginata*

A *Miconia ferruginata* DC, conhecida popularmente como pixirica-do-campo, é uma espécie arbustiva de 2 até 3 m de altura e encontra-se distribuída no Cerrado e campos rupestres. A *Miconia* é considerada como o maior gênero das Melastomataceae, com aproximadamente 1.050 espécies, distribuídas desde o sul do México até o norte da Argentina e Uruguai. No Brasil, estão representados por 281 espécies, das quais 122 são endêmicas (GOLDENBERG, 2012) e estão presentes nos estados do Pará, Tocantins, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Sergipe, Bahia e Pernambuco. Considera-se também que está inserida nos biomas da Caatinga e do Cerrado, principalmente nos afloramentos rochosos (rocha do campo), mas também em outras fisionomias do Cerrado como na Serra de Caldas Novas em Goiás (ROMERO et al., 2002) (GOLDENBERG et al., 2013).

Estudos descrevem que este gênero se diferencia de outras Melastomataceae pelas folhas destituídas de formicários, inflorescências terminais, pétalas usualmente

arredondadas a obtusas no ápice, cálice com lacínias externas reduzidas e frutos bacáceos (MARTINS et al., 1996, GOLDENBERG 2009). Rezende e colaboradores (2014) fizeram uma descrição botânica detalhada onde relatam que esta planta caracteriza-se também pelos ramos bastante robustos, rugosos, com estrias bem evidentes, grandes inflorescências escorpioides (14-38,5 cm compr.), folhas discolores, geralmente, grandes (7-32,5 × 2,5- 13 cm), indumento ferrugíneo recobrindo toda a planta, conectivo prolongado de 0,6 mm de comprimento abaixo das tecas, espessado no dorso, com expansão dorso-basal, dois apêndices ventrais, além disso, que pode ser coletada com flores desde fevereiro até outubro e com frutos de setembro a julho (Figura3). A Tabela 4 ilustra a sistemática da *Miconia ferruginata* (REZENDE, 2014).

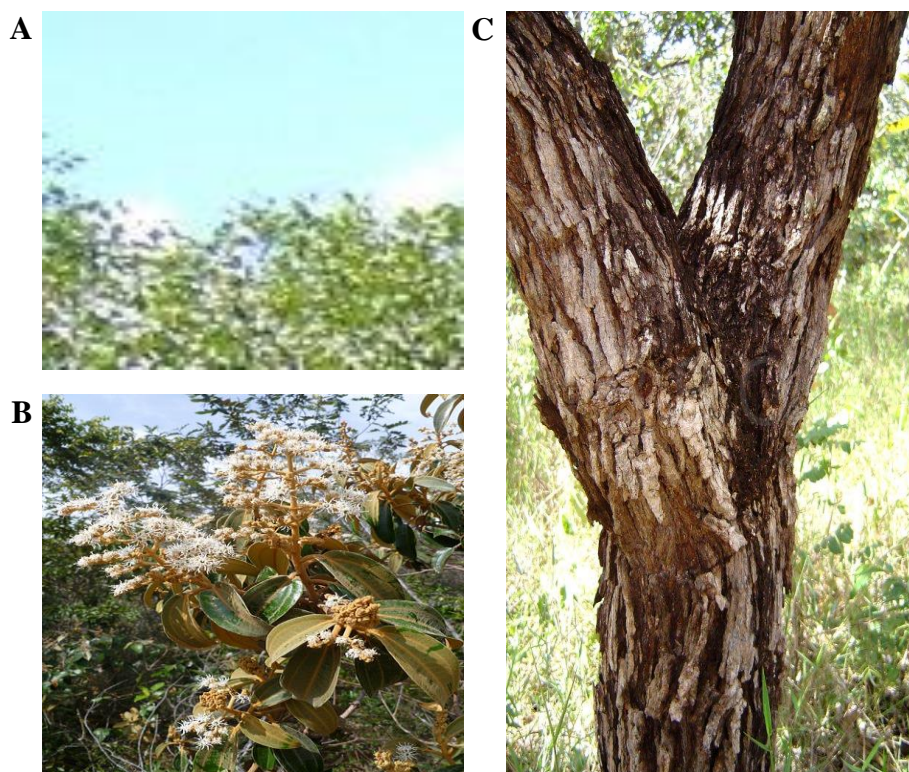


Figura 3-Imagens da *Miconia ferruginata*. A –Estrutura total da *Miconia ferruginata*. B- estrutura da planta com flores. C– estrutura das folhas do arbusto. Fonte: http://www.virboga.de/Miconia_ferruginata.htm, 2016.

Tabela 4- Posição sistemática da *Miconia ferruginata*

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novákex Takht.
Ordem	Myrtales Juss. Ex Bercht. & J. Presl
Família	Melastomataceae
Tribo	Miconieae
Gênero	<i>Miconia</i> Ruiz & Pav
Espécie	<i>Miconia ferruginata</i> DC

Como várias plantas desta família, a *Miconia ferruginata* tem sido utilizada com fins medicinais pela população brasileira em forma de infusões e banhos para tratamento de doenças de pele (ALMEIDA; BANDEIRA, 2010), como também para doenças de origens inflamatórias, parasitárias e infecciosas (CRUZ; KAPLAN 2004).

Apesar de ter relatos sobre o uso da *M. ferruginata* na medicina popular, não se tem encontrado na bibliografia estudos científicos aprofundados sobre esta espécie. Lima e colaboradores (2013) realizaram uma análise fitoquímica em Pirenópolis- Goiás, onde se revelou a presença de heterosídeos, flavonóides e saponínicos, cumarinas, triterpenos e taninos a partir do pó das folhas de plantas (LIMA, 2013). Posteriormente, em outro estudo foi realizada uma triagem fitoquímica em plantas coletadas no município de Diamantina-MG, na qual a partir dos extratos etanólicos e aquosos das folhas, flores e caules foram obtidos um perfil químico rico em compostos fenólicos tais como: taninos, ácidos fenólicos, flavonóides, e derivados glicosilados da quercetina identificados por meio de análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com arranjo de diodos acoplado a massas (CLAE-DAD-EM). Nesse mesmo estudo foram também analisados os constituintes voláteis por Cromatografia Gasosa acoplada a massas (CG-EM) identificando-se a presença de quatorze compostos correspondentes a diferentes classes de sesquiterpenos, hidrocarbonetos, monoterpenos, fenilpropanoides e álcoois, sendo os compostos maioritários os sesquiterpenos: β -cariofileno e α -humuleno, característicos por estar associados a várias atividades biológicas como anti-inflamatórios, antifúngicos e antitumorais. Além disso, foi feita uma análise das frações por CG-EM e CLAE-DAD identificando-se catequinas, ácido gálico e flavonóis nos

extratos aquosos e ésteres graxos e as subclasses das flavonas e flavonóis nos extratos etanólicos.

Nos extratos aquosos foi avaliado o efeito anti-proliferativo, *in vitro*, sobre linfócitos humanos do sangue periférico estimulados por mitógenos, apresentando uma alta eficácia quando comparado ao fármaco dexametasona. Finalmente neste estudo foi avaliado o efeito citotóxico dos extratos sobre células MDA-231(mama), evidenciando-se que os extratos etanólicos e aquosos das folhas, flores e caules apresentaram um alto potencial citotóxico dose-dependente sobre as células tumorais. No entanto, os mesmos extratos, quando inseridos em culturas de PBMC, não apresentaram citotoxicidade após 24h e 5 dias de incubação. (RIBEIRO, 2015).

Com base ao estudo realizado por Ribeiro (2015), em nossa pesquisa, foram escolhidos os extratos que apresentaram menor toxicidade sobre as PBMC e maior citotoxicidade sobre as células MDA-231, para verificar se os extratos produziram um efeito similar sobre a linhagem tumoral Jurkat. Além disso, também foi alvo de investigação avaliar outros aspectos que pudessem esclarecer os mecanismos de morte celular envolvidos na atividade citotóxica observada para essa planta.

3.4 Propriedades antitumorais em plantas

As plantas desde a antiguidade têm sido utilizadas para trazer benefícios à saúde humana, principalmente como fonte de medicamentos. Tem-se estimado que em torno de 80-85% da população mundial depende de medicamentos tradicionais para suprir suas necessidades primárias na saúde, sendo que uma parte utiliza a terapia tradicional mediante o uso de extratos de plantas ou seus princípios ativos. (TOMLINSON et al., 1998; ELUJOBA et al., 2005; IGNACIMUTHU et al., 2006). Embora existam vários estudos e pesquisas recentes sobre os avanços no tratamento e controle do câncer, ainda há muito trabalho e aspectos a serem explorados.

As principais desvantagens das drogas sintéticas são os efeitos secundários produzidos aos pacientes. No entanto, terapias naturais com o uso de plantas ou produtos derivados delas têm sido avaliados, obtendo-se resultados favoráveis. A busca de agentes antitumorais a partir de fontes vegetais começou na década de 1950, quando

se descobriu e desenvolveu os alcalóides da vinca: vinblastina e vincristina (Figura 4) e o isolamento das podofiloxitoxinas citotóxicas (GORDON et al, 2005).

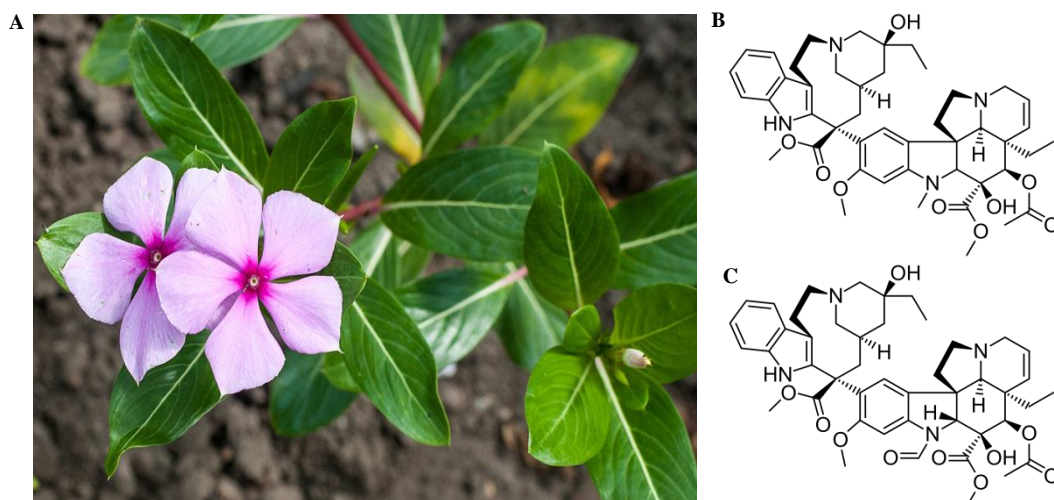


Figura 4-Imagem da *Catharanthus roseus* e estruturas químicas dos alcalóides da Vinca. A - *Catharanthus roseus* espécie nativa e endêmica de Madagascar. B – Estrutura vinblastina. C – Estrutura vincristina. Fonte: <https://www.plantas-venenosas.org/plantas-venenosas-2/> (2017).

A vinblastina (VLB) e a vincristina (VCR), alcalóides da planta *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), espécie endêmica de Madagascar, foram os primeiros agentes introduzidos para uso clínico. Os fármacos antitumorais a partir da VLB e VCR foram descobertos durante uma pesquisa de hipoglicemiantes orais. Embora os cientistas não tenham conseguido encontrar tal atividade, foi observado que ao tratar ratos com leucemia linfocítica com os dois alcalóides isolados da planta, houve um prolongamento no tempo de sobrevivência dos animais. Mediante outros estudos, foram descobertos análogos semi-sintéticos dos alcalóides de vinca: A vinorelbina e a vindesina, utilizados só em combinações com outros fármacos antitumorais, para combater distintos tipos de câncer. A vinblastina atualmente é utilizada para o tratamento de linfomas, leucemias, câncer de mama, câncer de testículo, câncer de pulmão e sarcoma de Kaposi. Já a vincristina tem apresentado eficácia contra a leucemia, particularmente a leucemia linfocítica aguda em infantes. De 2000 ensaios clínicos realizados no Instituto Nacional do Câncer (NCI) em busca de atividade antitumoral, 160 correspondem a ensaios feitos com esta planta ou da combinação dessa espécie com fármacos já conhecidos (GUERITTE et al., 2005).

Um avanço mais recente no desenvolvimento de agentes antitumorais de origem vegetal são os estudos sobre as moléculas taxanos. O Paclitaxel também chamado taxol, foi isolado de cortes da planta *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae) (Figura 5).

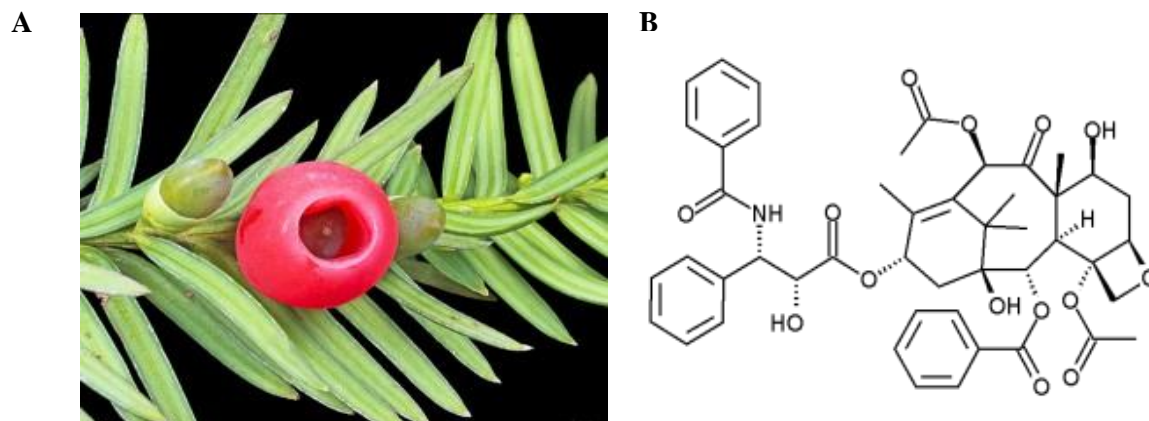


Figura 5-Imagem *Taxus brevifolia* e estrutura química do Taxol. A –*Taxus brevifolia*. B – Taxol composto ativo obtido da *T.brevifolia*. Fonte: <http://www.arsenalterapeutico.com/2015/10/19/tejo-taxus-brevifolia/> (2017).

Estudos revelam que várias partes de *T. brevifolia*, bem como outras espécies do gênero *Taxus*, como a *T. canadenses* e *T. baccata*, têm sido usadas por tribos americanas nativas com fins medicinais para o tratamento de doenças diferentes do câncer. No entanto, sabe-se que as folhas da *T.baccata* são usadas para o tratamento do câncer. Estudos do Paclitaxel mostram que este pode ser isolado de diferentes partes das plantas de espécies do gênero *Taxus*, e que por semi-síntese, a partir de compostos como as baccatinas, se obtém análogos como o Docetaxel (Taxotere), proporcionando uma fonte natural renovável importante para esta classe de drogas. O Paclitaxel tem sido usado para o tratamento de uma ampla variedade de tumores, incluindo o câncer de mama, ovário, pulmão e sarcoma de Kaposi, além de ter apresentado um grande potencial no tratamento de psoríase, escleroses múltiplas e artrite reumatóide. Por outro lado, seu derivado semi-sintético, Docetaxel, tem sido usado principalmente para o câncer de mama. A importância desta classe de compostos antitumorais pode avaliar-se no fato de que análogos de taxanos estão em desenvolvimento clínico e pré-clínico.

Segundo o NCI, 248 drogas são derivadas de taxano, incluindo 134 com Paclitaxel, 105 com Docetaxel e 9 com taxanos, sejam como agentes individuais ou em combinação com outros fármacos antitumorais (KINGSTON et al., 2005).

O número de medicamentos descobertos a partir de plantas cresce a cada dia. Novas plantas com atividade citotóxica sobre determinadas linhagens tumorais tem apresentado potencial promissor na busca de novos fármacos anticancerígenos. Na Tabela 5 encontram-se alguns outros exemplos de plantas com atividade antitumoral:

Tabela 5- Plantas vegetais com propriedades antitumorais no mundo

Nome botânico da planta e família	Parte da planta usada	Compostos ativos majoritários	Lugar de origem
<i>Agave americana</i> (<i>Agavaceae</i>)	Folhas	Saponinas, alcalóides, cumarinas, isoflavonóides, hecogenina e vitaminas A,B, C	América central
<i>Agropyron repens</i> (<i>Poaceae</i>)	Rizoma	Rizomas contendo óleo essencial, polisacarídeos e mucilagem	Europa
<i>Agrimonia pilosa</i> (<i>Rosaceae</i>)	Erva	Agrimonolida, flavonóides, triterpenos, taninos e cumarina	China, Japão ,Coréia, Índia
<i>Ailanthus altissima</i> (<i>Simaroubaceae</i>)	Tronco	Triterpenos, tanino, saponinas e quercetina-3-glucosídeo	China,Coréia
<i>Akebia quinata</i> (<i>Lardizabalaceae</i>)	Fruto	Flavonóides e saponinas	China,Coréia, Japão
<i>Alpinia galanga</i> (<i>Zingiberaceae</i>)	Rizoma	Kaemferida	Europa
<i>Aristolochia contorta</i> (<i>Aristolochiaceae</i>)	Raízes e frutos	lysicamine e oxaaporfina	China, Coréia
<i>Aster tataricus</i> (<i>Asteraceae</i>)	Planta completa	Triterpenos, monoterpenos e Epifriedelanol	Japão, Coréia
<i>Bryonia dioica</i>	Raíz	Cucurbitacina e glicosídeos	Europa
<i>Cannabis sativa</i> (<i>Cannabinaceae</i>)	Folhas	Estereoisômeros de canabitol	África do Sul
<i>Chelidonium majus</i> var. <i>Asiaticum</i> (<i>Papaveraceae</i>)	Erva	Alcalóides (sanguinarina, berberine)	Ásia, Europa
<i>Chimaphila umbellata</i> (<i>Ericaceae</i>)	Planta completa	Ericolina, arbutina, taninos	Asia, Europa

<i>Coix lachryma jobi</i> (Poaceae)	Semente	Trans-ferulil estigmaterol	China
<i>Dryopteris crassirrhizoma</i> (Polypodiaceae)	Rizoma	Ácido Filicínico, aspidinol e aspidina	China, Japão, Coréia
<i>Echinops setifer</i> (Asteraceae)	Planta completa	Echinopsine	Coréia
<i>Erythronium americanum</i> (Liliaceae)	Planta completa	Alfa-metilenobutirolactona	América do norte
<i>Euonymus alatus</i> (Celastraceae)	Planta completa	Triterpenos, eulatina, esteroides e alcalóides.	China, Japão, Coréia.
<i>Eupatorium cannabinum</i> (Asteraceae)	Planta completa	Sesquiterpenos, lactona, pyrrolizidina alcalóide flavonóide.	Europa, Ásia
<i>Fragaria vesca</i> (Rosaceae)	Folhas e frutos	Flavonóides, taninos, borneole e Ácido elágico	Ásia, Europa
<i>Fritillaria thunbergii</i> (Liliaceae)	Planta completa	Alcalóides e peimine	China, Sibéria
<i>Galium aparine</i> (Rubiaceae)	Folhas	Iridoide, ácido polifenólico, tanino, flavonóides	Europa, África
<i>Hydrastis canadensis</i> (Ranunculaceae)	Planta completa	Isoquinona alcalóides (Hidrastina, berberine, berberastina, candalina), resina e lactonas	Canadá, Estados Unidos
<i>Juncus effusus</i> (Juncaceae)	Planta completa	Tridecanona, efusol, juncanol, fenilpronoide e a-tocoferol	China, Japão, Coréia.
<i>Lantana camara</i> (Verbenaceae)	Planta completa	Alcalóides (Camerine, iscamerine, micranine, lantanine, lantadene)	América tropical
<i>Larrea tridentata</i> (Zygophyllaceae)	Planta completa	Resina	Sul este USA. México
<i>Olea europaea</i> (Oleaceae)	Folhas e óleo	Ácido oleico e polifenol	América
<i>Panax quinquefolium</i> (Araliaceae)	Raiz	Ginsenoside, sesquiterpeno, limoneno, vitaminas (B1, B2, B12)	China, Japão, Coréia.
<i>Phaleria macrocarpa</i>	Fruto	Ácido gálico	Indonésia
<i>Polygonatum multiflorum</i> (Liliaceae)	Planta completa	Saponinas, flavonóides e vitamina A	Ásia, Europa, América do Norte.
<i>Potentilla chinensis</i> (Rosaceae)	Planta completa	Ácido gálico e taninos	China, Japão, Coréia.

<i>Pygeum africanum</i> (<i>Boraginaceae</i>)	Folhas	fitosterol, triterpenos e taninos	África
<i>Pyrus malus</i> (<i>Rosaceae</i>)	Folhas e frutos	Quercetina, carechina, flavonóides, ácido cumárico e gálico e procianidina	Britânico

Fonte: PRAKASH. O., 2013.

3.5. Avaliação da ação antitumoral de fitoterápicos, *in vitro*.

A implantação de metodologias modernas para isolamento e identificação de compostos químicos tem sido crucial para a descoberta de novas substâncias bioativas. No transcorrer do tempo foram desenvolvidos métodos de *screening* biológico, que permitem avaliar *in vitro* diversas substâncias frente a alvos biológicos específicos em curto espaço de tempo (F R E S H N E Y , 2 0 0 5). Uma das principais vantagens dos ensaios *in vitro* é restringir o uso de animais ao menos na fase de triagem das pesquisas (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991), além de apresentarem boa reprodutibilidade, fácil execução, baixo custo e relevância científica (SKEHAN et al., 1990).

O uso de culturas celulares tem permitido um grande avanço nos estudos *in vitro*, proporcionando maior compreensão da biologia celular e dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de carcinogênese (AMARAL; MACHADOSANTELLI, 2011). Nos ensaios *in vitro*, as culturas celulares podem ser classificadas como: Culturas derivadas de explantes primários, ou de suspensão de células dispersas. O primeiro tipo de cultura é também conhecido como cultura celular em camada e se caracteriza por fazer uso de um substrato sólido para promover o crescimento celular. Já as suspensões celulares são aquelas culturas formadas por células livres, e/ou agregados celulares distribuídos sobre um meio de cultura em movimento. (FRESHNEY, 2005)

Nas triagens preliminares para determinação de agentes antitumorais são usadas linhagens celulares derivadas de tumores humanos, as quais são expostas a substâncias específicas durante um determinado período de tempo, para depois avaliar parâmetros como: viabilidade celular; atividade citotóxica, proliferação celular, ciclo celular entre outros. Alterações nesses parâmetros podem dar um indicativo sobre o modo de ação de

um determinado composto e prever se tal substância (ou mesmo mistura) possui potencial anticancerígeno (SKEHAN et al., 1990; MONKS et al., 1991; FRICKER e BUCKEY, 1996; LIEBERMAN et al., 2001). A maior parte das linhagens celulares tumorais usadas são adquiridas em centros privados de referência para pesquisa biológica capacitados na aquisição, autenticação, produção, preservação, desenvolvimento e distribuição de linhagens celulares, bem como materiais utilizados em pesquisa científica. Um dos centros mais reconhecidos em nível mundial é o Comitê para Coleção de Cultura Celular (ATCC), que atualmente, conta uma coleção de mais de 3600 linhagens celulares (humanas, animais e vegetais) (ATCC, 2012).

No presente estudo, foi usada a linhagem tumoral Jurkat, correspondente a uma linhagem imortalizada de células linfocitárias T. As células Jurkat são usualmente empregadas em estudos de leucemia celular aguda assim como também em pesquisas sobre marcação e expressão de receptores de quimocinas susceptíveis a entrada viral, particularmente o vírus da imunodeficiência humana (HIV). As células Jurkat fazem parte de uma das linhagens mais importantes dentro da pesquisa científica, principalmente por sua habilidade de produzir interleucina 2 (IL-2) (SCHNEIDER et al, 1977).

Tendo em vista os estudos prévios realizados no laboratório de Imunologia da UFVJM onde foram avaliados o efeito tóxico dos extratos vegetais de *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Ageratum fastigiatum* e *Miconia ferruginata* sobre linfócitos T periféricos, resolvemos investigar se os extratos vegetais dessas plantas apresentariam ou não toxicidade sobre a linhagem tumoral Jurkat. Para tal foi empregado o ensaio de citotoxicidade por ser um dos primeiros métodos a ser utilizados na avaliação da atividade antitumoral (HOUGHTON et al., 2007).

A atividade citotóxica pode ser avaliada por parâmetros que incluem desde a morte até alterações metabólicas celulares. A maioria das pesquisas avalia a citotoxicidade por meio de ensaios buscando a concentração requerida para produzir morte em 50% das células (concentração letal de 50% - LC₅₀). Essa concentração pode depender de diversos fatores como a concentração da substância (Extrato, composto, medicamento, dentre outros), acessibilidade, permeabilidade celular, tempo de incubação, tipos de células utilizadas, etc. (FRESHNEY, 2005)

As metodologias para a avaliação do potencial citotóxico são variadas, porém todas medem a taxa de crescimento, multiplicação e morte celular. Para isto são usados indicadores de viabilidade celular que permitem a formação de coloração: quanto maior intensidade da cor maior será o número de células presentes e vice-versa. (HOUGHTON et al., 2007).

Dentro dos corantes utilizados para essa finalidade está o azul de tripan e a eosina, cujo princípio baseia-se na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis permitindo, deste modo, a passagem do corante do meio extracelular para o meio intracelular, sendo possível observar a marcação das células mortas (TENNANT, 1964). A contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos dentre os quais citam-se: Cristal violeta; MTT (microtetrazolium), Alamar blue e SRB (sulforrodamina B) (MACIEL et al., 2002; HENRIKSSON et al., 2006) também são comumente utilizados.

Mediante técnicas mais sofisticadas como ensaios fluorimétricos por citometria de fluxo, também é possível avaliar o potencial citotóxico de determinadas substâncias. Para isto são usados sondas fluorescentes ou mesmo anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, direcionados para determinados marcadores celulares. Tal marcação permite fazer uma distinção entre células viáveis e não viáveis como por exemplo, o marcador Hoechst-33342 caracterizado por corar células viáveis ou fixadas e o azul de tripan que apresenta mecanismo semelhante ao do iodeto de propídeo (PI) uma vez que emite fluorescência em células não viáveis que perderam a integridade da membrana celular (AVELAR-FREITAS et al., 2014).

A Citometria fluxo tem permitido avaliar outros aspectos como as alterações no conteúdo de DNA nas fases do ciclo de celular (BARLOGIE, 1976; MELAMED, 1991). Atualmente se dispõe de várias sondas fluorescentes capazes de interagir especificamente às bases do DNA com destaque para os intercalantes como o brometo de etídio, iodeto de propídeo e laranja de acridina, que unem-se ao material genético de dupla cadeia intercalando-se entre as duas fitas. Também podemos destacar as sondas fluorescentes de união específica às bases adenina-timina, como o 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), DIPI e Hoescht, e por último estão os de união preferente às bases citosina-guanina como a mitraminicina, olivomicina, e cromomicina A3. As células

marcadas com a sonda fluorescente se unem estequiometricamente aos ácidos nucleicos, emitindo uma fluorescência proporcional ao conteúdo cromossômico total, produzindo um padrão característico que reflete as fases do ciclo celular da população de estudo. O ciclo celular pode ser evidenciado mediante um histograma de fluorescência emitida versus o número de eventos analisados, conforme a Figura 6 (BONO, 1998).

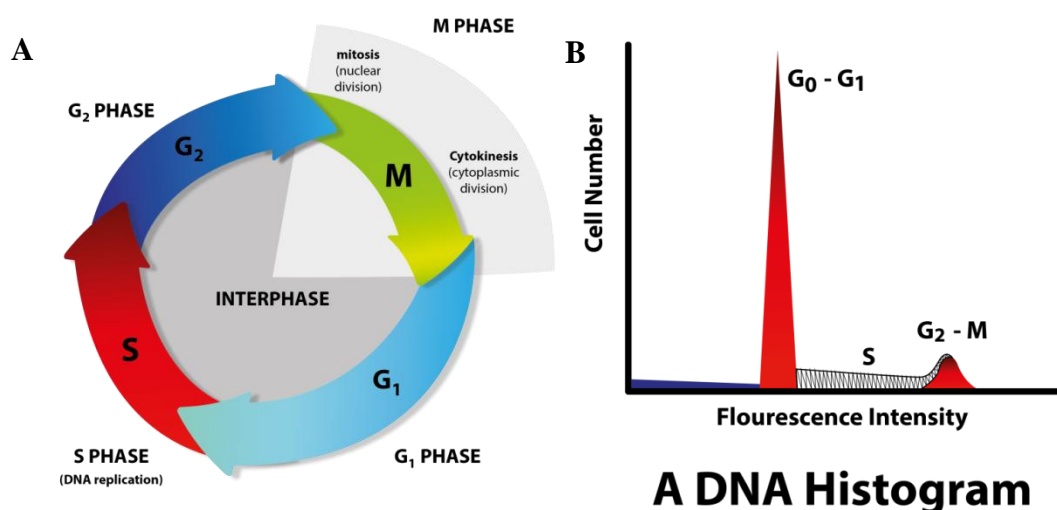


Figura 6-Fases do ciclo celular. A- fases do ciclo celular. B- histograma de DNA diploide por citometria de fluxo. Fonte: Elaborado pelo autor.

A fluorescência medida nas células em fase de repouso (G0-G1) e em fase de pré-síntese de DNA (G1) produzem um pico com distribuição normal. Já as células em fase G2M possuem o dobro de DNA em comparação as células na fase G1 (RABITNOVICH, 1993). Os fatores que limitam a largura dos picos de G1 e G2M, também afetarão a amplitude da fase S, portanto, para calcular os percentuais para cada fase é recomendável usar métodos computacionais já padronizados os quais fornecem três métodos de análise: Univariado, bivariado e multivariado, sendo primeiro o mais utilizado (GRAY, 1991)

O método *univariado* oferece duas plataformas baseadas nos algoritmos de Watson (WATSON, 1987) e Dean e Fox Jett (FOX, 1980). O modelo de Watson requer uma localização inicial do pico G0-G1 em uma distribuição Gaussiana, uma vez é calculado o percentual dessa população. O pico G2M é localizado 1,75 vezes a intensidade do pico G0-G1, sendo teoricamente o pico G2M duas vezes mais fluorescente que o pico G0-G1. O modelo Dean Fox Jett identifica os picos G0-G1 e G2M de forma semelhante ao método de Watson, no entanto propõe um modelo polinomial para calcular o percentual de eventos na fase S. O método *bivariado* foi

proposto para identificar o DNA que está sendo sintetizado na fase S. Para este tipo de análise, as células são tratadas com marcadores como: Bromodesoxiuridina (BrdU) ou análogos desta. Já o método *multivariado* consiste na criação de um modelo para tratar um conjunto de dados a fim de encontrar uma equação ou equações que se aproximem a distribuição deles (DEAN, 1974).

Através de citometria de fluxo também é possível avaliar eventos de apoptose e necrose. A Anexina V possui uma afinidade específica sobre resíduos de Fosfatidilserina expostos na superfície celular de células em eventos precoces de morte celular. Desse modo, o uso de Anexina V, por citometria de fluxo, pode auxiliar a investigação sobre o tipo de morte celular envolvido. A translocação da Fosfatidilserina é um processo que acontece antes da perda da integridade da membrana e que acompanha as etapas posteriores da morte celular, evoluindo em seguida para processos apoptóticos ou necróticos. A marcação com Anexina V geralmente é usada junto com PI para identificar eventos em apoptose recente e tardia. Desse modo, as células viáveis com membrana intacta serão excluídas pelo PI, e aquelas células que sofreram perda da integridade de suas membranas serão marcadas pelo Iodeto de propídeo, sendo consideradas como células mortas (VERMES et al., 1995). Durante a análise por citometria de fluxo, os eventos observados e analisados em gráficos de distribuição pontual se apresentam conforme a Figura 7:

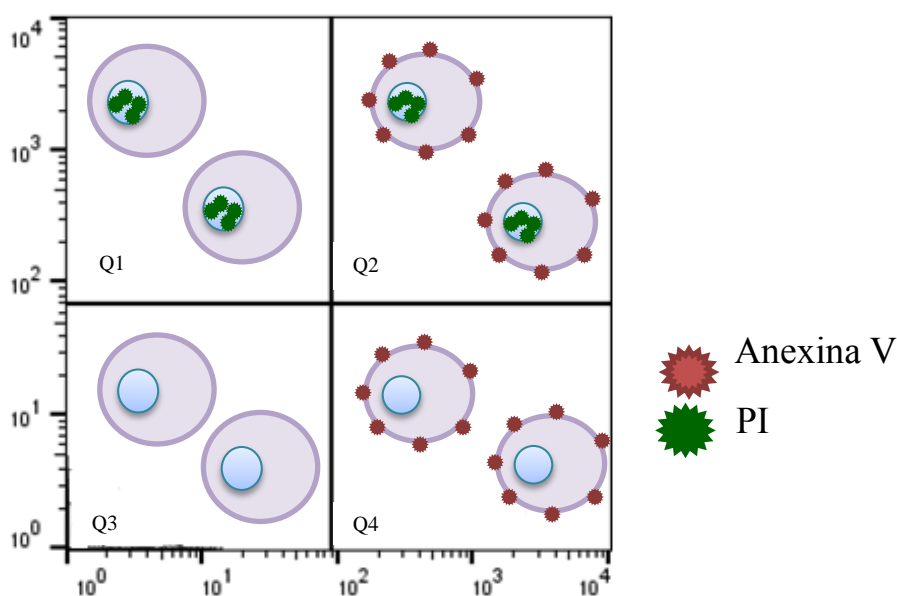


Figura 7-Esquema ilustrando a distribuição de células marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo, após análise por citometria de fluxo. Fonte: Elaborado pelo autor.

Sendo consideradas como células viáveis as células Anexina V e PI não fluorescentes; células em apoptose recente com marcação positiva para Anexina V e negativas para PI; células em apoptose tardia como sendo as células positivas para a marcação com Anexina V e PI positivos; e células necróticas como sendo Anexina V negativos e positivas para a marcação com PI.

4. METODOLOGIA

4.1.1 *Pseudobrickellia brasiliensis*

4.1.1.1 Identificação taxonômica

As amostras de *P. brasiliensis* contendo flores foram coletadas no Campus Juscelino Kubitscheck da UFVJM, em Diamantina-MG. A identificação botânica foi realizada no Herbário Dendrológico Jeanini Felfili – HDJF da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- UFVJM, onde as exsiccatas foram depositadas sob o número de registro 2819, 2820 e 2821. As partes aéreas de *P. brasiliensis* foram coletadas no período matutino (horas de temperatura mais baixa e menor insolação) do dia 04 de setembro de 2013, em dia não chuvoso à margem direita da Rodovia Estadual MGT 122, em Diamantina- Minas Gerais (18°13'23.99" S w 43°36'17.45"). Como preconizado na Instrução Normativa 154/2007 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) foi obtida a autorização para coleta de material botânico, com registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) 35605-1 (ANEXO B).

4.1.1.2 Preparo de extratos brutos

Após a coleta, as folhas foram dissecadas em bancada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar direta. O material coletado foi seco à temperatura ambiente até atingir peso constante. Em seguida as folhas foram rasuradas, armazenadas em recipientes de vidro âmbar e maceradas em acetato de etila, etanol e água. Ao término da maceração, o extrato etanólico foi filtrado e concentrado em rotaevaporador (40-42°C, sob pressão reduzida).

4.1.1.3 Diluição dos extratos

O extrato etanólico da *P. brasiliensis* foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 20mg/mL, as alíquotas foram acondicionadas a -20°C até o momento do uso.

4.1.2 *Miconia ferruginata*

4.1.2.1 Identificação taxonômica

A espécie *M. ferruginata* foi coletada na região norte de Minas (código do coletor n° LEG 67), na comunidade Ribeirão de Areia, Diamantina – MG. A espécie não consta da Lista Nacional Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2014a). O material coletado foi georeferenciado (18°11'08.0"S 43°42'11.0"W) e o *voucher* foi depositado no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF) e no herbário DIAM da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) sob os números de registro HDJF2953 e DIAM 4964, respectivamente. A identificação foi realizada por João Paulo Goulart Mendes, vinculado ao Departamento de Engenharia Florestal da UFVJM. Como preconizado na Instrução Normativa 154/2007 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) foi obtida a autorização para coleta de material botânico, com registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) 29793-4 (ANEXO C).

4.1.2.2 Preparo de extratos brutos

A preparação dos extratos foi realizada no Laboratório do Núcleo de Estudos de Produtos Naturais (NEPRONAT) da UFVJM. O material coletado constitui-se de caule da planta, que posteriormente submetido à secagem em estufa de ar circulante (Biopar®) a 40 °C, durante uma semana. Após esse período, o material foi pulverizado em moinho de facas (Marconi®Piracicaba, SP, BR), obtendo 705,0 g de caule. O pó obtido foi armazenado em sacos plásticos, a temperatura ambiente, em local fresco até o momento do preparo dos extratos.

Para a preparação dos extratos etanólicos e aquosos do caule de *M. ferruginata*, o extrato etanólico foi preparado a partir do material pulverizado submetido à extração por maceração durante uma semana na proporção: 100 g planta para 1 L solvente (1:10). Foi usado etanol 96 °GL (Dinâmica®) como solvente extrator e após do período da maceração, os extratos foram filtrados em algodão e concentrados em evaporador rotativo (Fisaton®São Paulo, SP, BR), entre 40 e 45°C sob pressão reduzida.

Por outro lado os extratos aquosos foram preparados por infusão, utilizando 50 g do material pulverizado que foi exposto a 500 mL de água Milli-Q fervente, deixado em contato por 10 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, o infuso foi filtrado em algodão, congelado em nitrogênio líquido e seco em liofilizador (Terroni®).

Os extratos etanólicos e aquosos obtido dos caules da planta foram transferidos para frascos âmbar previamente tarados, os quais foram submetidos à secagem final a temperatura ambiente em dessecador sob vácuo contendo sílica gel.

4.1.2.3 Diluição dos extratos

Os extratos Mfet e Mfaq foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), na concentração de 20 mg/mL e as alíquotas foram acondicionadas a -20°C até o momento do uso. Para o uso de qualquer dos extratos as alíquotas foram, então, descongeladas e utilizadas em temperatura ambiente.

4.1.3 *Ageratum Fastigiatum*

5.1.3.1 Identificação taxonômica

As partes aéreas (ramos com folhas e inflorescências) de *A. fastigiatum* foram coletadas no Campus Juscelino Kubitscheck - UFVJM (S 18°12.125' W 43°34.367', altitude 1392 m), localizado no município de Diamantina, Minas Gerais. O material testemunho foi depositado no Herbário DIAM UFVJM, sob número de registro 1300. Como preconizado na Instrução Normativa 154/2007 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) foi obtida a autorização para coleta de material botânico, com registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) 26221-1(ANEXO D).

4.1.3.2 Preparo de extratos brutos

As partes aéreas da planta foram secas em estufa de ar circulante a 40°C. Em seguida, o material vegetal foi pulverizado em moinhos de facas (Marconi®, Piracicaba, SP, BR) e utilizado para confecção do extrato. O material pulverizado foi macerado na proporção de 1:5 (m/v), sequencialmente em n-hexano, acetato de etila e etanol (96% v/v). A maceração em cada solvente foi realizada com agitação manual e ocasional por 3 dias.

Os extratos obtidos foram filtrados em algodão e, em seguida, concentrados em evaporador rotativo (Fisatom®, São Paulo, SP, BR) (40 – 42 ° C, sob pressão reduzida) e armazenados em frascos de vidro protegidos com papel alumínio e ao abrigo da luz solar direta. Após completa evaporação do etanol, foram obtidos 9g do extrato etanólico.

4.1.3.3 Diluição dos extratos

O extrato de *A. fastigiatum* foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, local, país), na concentração de 8 mg/mL e as alíquotas foram acondicionadas a -20°C até o momento do uso.

4.2 Critérios de inclusão e sujeitos da pesquisa

O recrutamento dos voluntários da presente pesquisa foi realizado através da abordagem de estudantes da UFVJM nas dependências da universidade. Os voluntários foram informados, detalhadamente, dos objetivos e metodologias do estudo antes da coleta de sangue. Após serem esclarecidos dos objetivos da pesquisa, aqueles que concordaram e que estavam aptos a participar do estudo, deram seu consentimento livre e esclarecido (ANEXO E). O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), protocolado sob o registro nº1.018.204 (ANEXO F).

Foram incluídos no estudo indivíduos adultos (idade entre 20-39 anos), que não apresentavam alguma doença infecciosa, autoimune, crônico degenerativa, hipersensibilidade ou gravidez. Também foram excluídos os indivíduos que relataram uso ou tratamento nos com drogas imunossupressoras últimos 30 dias. No total, 12

voluntários participaram do estudo, sendo 8 homens e 4 mulheres, com idade média de 26 ± 4 anos. Os procedimentos experimentais descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Imunologia do Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde (CIPq-Saúde) da UFVJM.

4.3 Amostras biológicas

A amostra biológica consistiu de 15 mL de sangue venoso, coletados de forma asséptica por punção da veia antecubital mediana, na fossa antecubital, utilizando tubos a vácuo heparinizados. Os procedimentos de coleta foram conduzidos por pessoal treinado e capacitado para tal e obedeceram as Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso (2010). Após a utilização da amostra biológica nas análises descritas a seguir, todo o material remanescente foi descartado adequadamente.

4.4 Parâmetros hematológicos

Para obtenção dos valores de leucócitos totais e da série vermelha (hemácias, hemoglobina e hematócrito) foi utilizado o contador automático de células CELM CC-550® (CELM, Barueri, SP, Brasil). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada pela observação em microscópio óptico do esfregaço sanguíneo corado com Giemsa e May- Grunwald, conforme descrito em Carvalho e Silva (1988).

4.5 Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) Humano

Para a separação das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC), os 15mL do sangue coletado nos tubos contendo heparina (Vacutainer; Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), foi diluído (1:1) em Tampão Fosfato de Salina (PBS) (NaCl 1,50 M; Na_2HPO_4 0,08M; NaH_2PO_4 0,02M, pH 7,20-7,40, esta solução (sangue/PBS) foi adicionada a tubos de polipropileno (BD Falcon™; 50mL) contendo Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) numa proporção de 1:2 (Ficoll-Histopaque: Sangue/PBS). Após centrifugação dos tubos (400 g, 21°C, 30 min) conforme descrito por Bicalho e colaboradores (1981). O anel de PBMC formado na interface entre o Ficoll e o plasma foram recolhidos com uma pipeta e colocados em tubos de polipropileno (BD Falcon™; 50mL). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação durante 15 minutos (250 g, 4°C) com PBS. Finalizadas as lavagens as células foram ressuspensas PBS ou RPMI suplementado com L-glutamina (Sigma, St.

Louis, MO, EUA) (2 mM), e coquetel antibiótico/antimicótico (penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 ng/mL - Sigma, St. Louis, MO, EUA), e contadas em câmara de Neubauer (Loptik Labor, em uma diluição (1:20) com azul de Trypan(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e ajustadas para a concentração desejada de 1×10^7 células/mL.

4.6 Células da linhagem contínua Jurkat

Para este estudo, foi utilizada a linhagem de células Jurkat (linfócitos T) derivadas de leucemia (SCHNEIDER et al., 1977) provenientes da coleção de culturas ATCC (American Type Culture Collection, ATCC®, número de catálogo: TIB-152™) que foram gentilmente doadas pelo Doutor Kuan Teh Jeang do Laboratório Molecular Microbiology do National Institutes of Health (NIH). Estas células tem por característica o crescimento em suspensão. O meio no qual essa linhagem foi cultivada foi o RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) (10%), (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) antibiótico/antimicótico (penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 ng/mL - Sigma, St. Louis, MO, EUA). Para manter o estoque de células, parte das células foram congeladas em alíquotas de 1mL na 6ª passagem a 1×10^6 cel/mL e 5% de dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a para desidratar as células e impedir que elas sejam criofraturadas pelos cristais de gelo formado, após de 15 minutos da adição de DMSO as amostras foram adicionadas em tubos criogênicos de 2mL e estocadas em um freezer a -80°C.

4.6.1 Descongelamento e manutenção de células de linhagem contínua Jurkat

Para cada experimento coma linhagem celular Jurkat foi retirado do freezer (-80°C) um criotubo com células da 6ª passagem, e foram descongeladas à 37°C em banho-maria, até formar um estreito anel de gelo. Em seguida, o criotubo foi levado até um ambiente estéril, na capela de fluxo laminar, onde foi finalizado o descongelamento à temperatura ambiente.

Previamente a esse processo, foram preparados dois tubos, um com 9 mL do meio de cultivo RPMI suplementado com 10% de SFB (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) e 1% de L-glutamina(Sigma, St. Louis, MO, EUA),

antibiótico e antimicótico (penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 ng/mL - Sigma, St. Louis, MO, EUA), utilizado exclusivamente para a lavagem das células por centrifugação, enquanto o outro tubo continha 10mL desse mesmo meio de cultura suplementado com SFB a 20%, L-glutamina (2 mM), coquetel antibiótico/antimicótico, ambos a 1% de concentração.

Após a centrifugação, as células foram colocadas no meio de cultivo suplementado com 20% de SFB para auxiliar na sobrevivência das mesmas, uma vez que logo após do descongelamento tais células precisam de uma maior quantidade de nutrientes.

A suspensão de células foi transferida para uma garrafa de cultura estéril e incubadas a 37°C e a 5% de CO₂. A cultura foi monitorada em garrafas de 15mL estéreis (TPP ®) diariamente durante todo o período experimental até obtenção da quantidade de células para realização dos ensaios. As células foram submetidas a uma nova cultura cada vez que o meio de cultura ficava turvo ou quando a linhagem celular fosse atingida a 8ª passagem.

4.7 Avaliação da citotoxicidade do solvente DMSO sobre células Jurkat

Uma vez que os extratos vegetais seriam diluídos em DMSO (Sigma, St. Louis, MO, EUA), inicialmente, investigou-se a concentração máxima de DMSO que não alteraria a viabilidade das células Jurkat após 24, 48 ou 72 horas de cultura. Desta forma foram incubados 100µL de suspensão de células Jurkat (2×10^6 cel/mL) em meio contendo RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen Corporation (2mM) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), Grand Island, NY, EUA) acrescido de L-glutamina (2mM) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) (10%), e coquetel antibiótico/antimicótico (penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 ng/mL - Sigma, St. Louis, MO, EUA). Foram preparadas culturas na ausência (CONT), e presença de DMSO nas concentrações de 1%, 2%, 4% e 8%. Além disso, também foram confeccionadas culturas de células Jurkat tratadas com Paclitaxel (PCX) a 400nM (Quiral Química®) correspondente ao controle positivo de morte celular. As culturas foram realizadas em tubos côncavos (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e incubadas por 24, 48 e 72h de cultura em estufa a

37°C e 5% CO₂ e 95% de umidade. Após esse tempo, as células foram removidas dos tubos e lavadas com 1 mL de PBS, e transferidas para tubos de poliestireno (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) seguido de centrifugação (240 g, 18° C, 7 min).

Dessa forma, seguindo a metodologia proposta por Avelar-Freitas (2014), 10 µL da suspensão celular foram incubados com 190µL da solução de azul de tripan (0,002%) e os dados de viabilidade celular foram adquiridos em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II® - Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) com aquisição de 10000 eventos para cada cultura (BRITO-MELO et al., 2006), utilizando o software BD FACSDiva versão 6.0. A análise dos dados foi realizada no software FlowJo 10.0.7.

A estratégia utilizada para a análise dos dados está ilustrada na Figura 8. Foram utilizados gráficos de distribuição pontual de granulosidade (SSC-A) versus tamanho celulares (FSC-A), para a seleção da população com características morfológicas semelhantes, correspondentes às células Jurkat (Figura 8A). Posteriormente, a porcentagem de células viáveis e não viáveis de células tratadas com DMSO foi analisada em histogramas de intensidade de fluorescência no canal de Azul de tripan no citômetro FACSCanto II ® em função do número de eventos (Figura 8B).

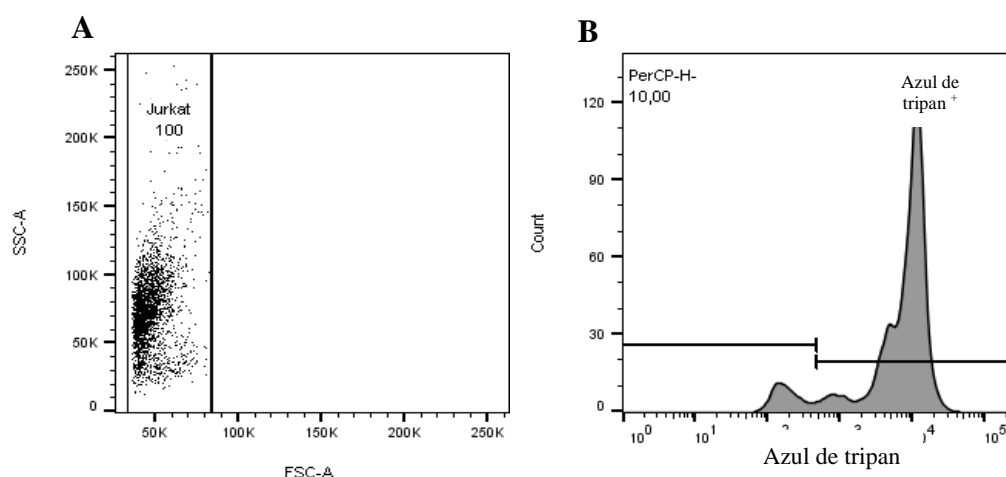


Figura 8-Estratégia de análise utilizada para avaliar a citotoxicidade de Dimetilsulfóxido sobre células Jurkat. A- Seleção da população de células Jurkat em gráficos de distribuição pontual tamanho (FSC) versus granulosidade celular (SSC). **B-** Histogramas em função da intensidade fluorescência no canal de Azul de tripan (PerCP-H) no citômetro de fluxo BD FACSCanto II.

4.8 Avaliação da citotoxicidade dos extratos vegetais sobre células Jurkat e PBMC

Com o intuito de verificar se os extratos vegetais apresentavam ou não toxicidade sobre as células Jurkat foi realizado o ensaio de citotoxicidade, usando o procedimento descrito a seguir. Foram incubados 100 μL de Jurkat (2×10^6 cel/mL) ou 50 μL de PBMC (1×10^7 cel/mL) em RPMI suplementado e foram confeccionadas culturas na ausência (CONT) ou presença do extrato de PBf em concentrações 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, os extratos Mfaq e Mfet em concentrações de 31,2 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$, e o extrato de Afpa em concentrações de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$. Culturas celulares tratadas apenas com DMSO constituíram o grupo controle do solvente. As culturas controle do solvente receberam um volume de DMSO equivalente ao volume do solvente utilizado na diluição da maior concentração dos extratos, sem ultrapassar a quantidade de DMSO tóxica avaliada previamente como descrito anteriormente. Foram também confeccionadas culturas de Jurkat tratadas com Paclitaxel (PCX) a 400nM (Quiral Química®) e de PBMC tratadas com cloreto de cádmio (CdCl_2) a 20mM (Proquimios®) que constituíram os controles de morte celular. As culturas foram incubadas por 24, 48 e 72h e, após esse tempo, as células foram submetidas à lavagem e centrifugação.

As células tratadas com os extratos Mfaq, Mfet e Afpa exibiram autofluorescência nos canais do citômetro que seriam utilizados para avaliar a viabilidade com corantes fluorescentes tais como azul de tripan e iodeto de propídeo (dados não mostrados). Portanto, a viabilidade celular foi avaliada por exclusão com azul de tripan por meio da microscopia mediante a contagem das células em câmara de Neubauer. Para isso, 10 μL das suspensões celulares das culturas tratadas com os extratos Mfaq, Mfet e Afpa foram incubadas por 5 minutos com 10 μL azul de Tripan a 0,4%. O percentual de células viáveis foi calculado pelo total de células não coradas no universo de células contadas (coradas e não coradas)

Para as células tratadas com PBf, foi possível avaliar a viabilidade por citometria de fluxo utilizando o corante fluorescente iodeto de propídeo, marcador de morte celular que permitiu a análise de fluorescência num canal diferente ao canal onde tinha sido detectada a fluorescência interferente desse extrato (ALMEIDA, 2015). O PI atua se intercalando entre as bases nitrogenadas do DNA produzindo fluorescência detectável

pela técnica de citometria de fluxo. Após excitação pelo laser azul (490 nm), esse corante emite fluorescência na região do amarelo (emissão máxima: 617 nm). Na presença de lesão na membrana celular, o corante consegue atingir o interior o núcleo da célula para se ligar ao DNA. Portanto, as células tratadas com PBf foram marcadas com PI usando 10 μ L de suspensão celular e 10uL de PI a 5 μ g/mL (BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA) e foram submetidas a incubação durante quinze minutos ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 180 μ L de PBS, e finalmente realizada a aquisição dos dados por citometria de fluxo, por meio do citômetro BD FACScanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Foram adquiridos pelo menos 10000 eventos, dentro de uma região (gate) correspondente as Jurkat ou PBMC. A aquisição e análise dos dados, foi feita com o software BD FACSDiva versão 6.0 e o software FlowJo, versão 10.0.7, respectivamente.

A estratégia de análise empregada foi a mesma apresentada na Figura 8, no entanto, a determinação das porcentagem de células viáveis foi feito mediante a realização de histogramas de fluorescência PE-H versus o número de eventos como pode ser observado na Figura 9.

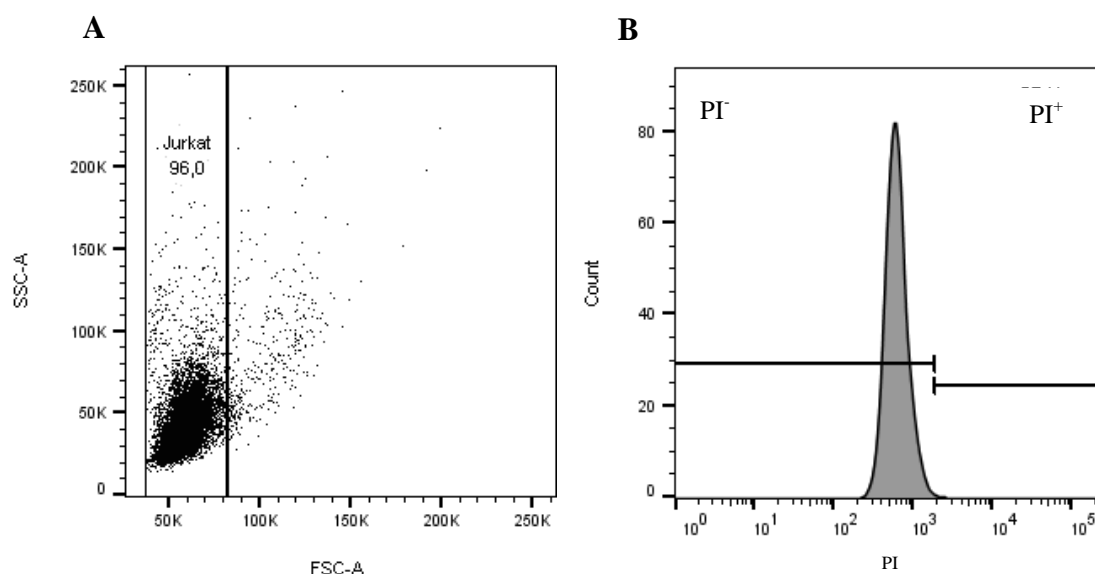


Figura 9-Estratégia de análise utilizada para avaliar a citotoxicidade do extrato *P. brasilensis* sobre células Jurkat ou células mononucleares do sangue periférico. A- Seleção da população celular em gráficos de distribuição pontual tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). **B-** Histogramas em função da intensidade de fluorescência no canal de Iodeto de propídeo (PE-H) no citômetro de fluxo BD FACScanto II.

4.9 Avaliação da atividade biológica do extrato vegetal sobre o ciclo celular de Células Jurkat

Para a análise do ciclo celular de células Jurkat, as mesmas foram contadas e ajustadas a uma concentração de $2,0 \times 10^6$ células/mL. Foram confeccionadas culturas na ausência (CONT) ou presença dos extratos PBf a $200\mu\text{g/mL}$, os extratos Mfaq e Mfet a $125\mu\text{g/mL}$, e o Afpa a $50\mu\text{g/mL}$, cujas concentrações correspondem àquelas que se mostraram tóxicas para células Jurkat e não tóxicas para as PBMC. Também foram preparadas culturas contendo PCX a 400nM (Quiral Química®) como controle de morte celular. As culturas celulares foram realizadas em tubos côncavos (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% CO_2 e 95% de umidade. Após esse tempo, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e transferidas para tubos de poliestireno (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), seguido de centrifugação (240 g , 18°C , 7 min). Após a lavagem das células, as mesmas foram submetidas ao tratamento com $500\mu\text{L}$ de solução hipotônica fluorescente (SHF), composta de citrato de sódio e Triton X-100, ambos ao 0,1% e 5% de solução de iodeto de propídeo ($50\mu\text{g/mL}$). As células foram incubadas por 30 minutos à temperatura de 4°C , sob abrigo da luz. A SHF promove o rompimento da membrana celular e os núcleos celulares permanecem marcados pela ligação do iodeto de propídeo ao DNA (RICCARDI e NICOLETTI, 2006). Quando finalizado o período de incubação, as culturas foram avaliadas por citometria de fluxo. Foram obtidos 10000 eventos, em um baixo fluxo de aquisição de eventos, com o auxílio do citômetro BD FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Para a aquisição dos dados, foi usado o software CELLQuest, versão 3.3, enquanto a análise dos dados foi obtida com o auxílio do software FlowJo, versão 10.0.7.

Na Figura 10 está representada a estratégia de análise adotada para a avaliação do ciclo celular das células Jurkat. Inicialmente foi gerado um gráfico bidimensional de distribuição pontual de tamanho celular FSC-H versus granulosidade SSC-H, para selecionar uma região compatível morfolologicamente com os núcleos celulares (Figura 10A). Em seguida, os eventos selecionados foram analisados em um gráfico de distribuição pontual de PI em função ao SSC-H correspondente aos eventos que se encontravam em um dos quatro estágios

interfásicos do ciclo celular (Figura 10B). O conteúdo relativo de DNA celular nas fases G1, S e G2M foram calculados usando a aplicação “Cycle Cell” do Software FlowJo versão 10.0.7 mediante o modelo proposto por Watson, onde foram feitos os *gates* selecionando a população em G1 e G2M. O programa calculou, mediante uma curva de distribuição Gaussiana, os percentuais de cada uma das fases incluindo a fase S (Figura 10C).

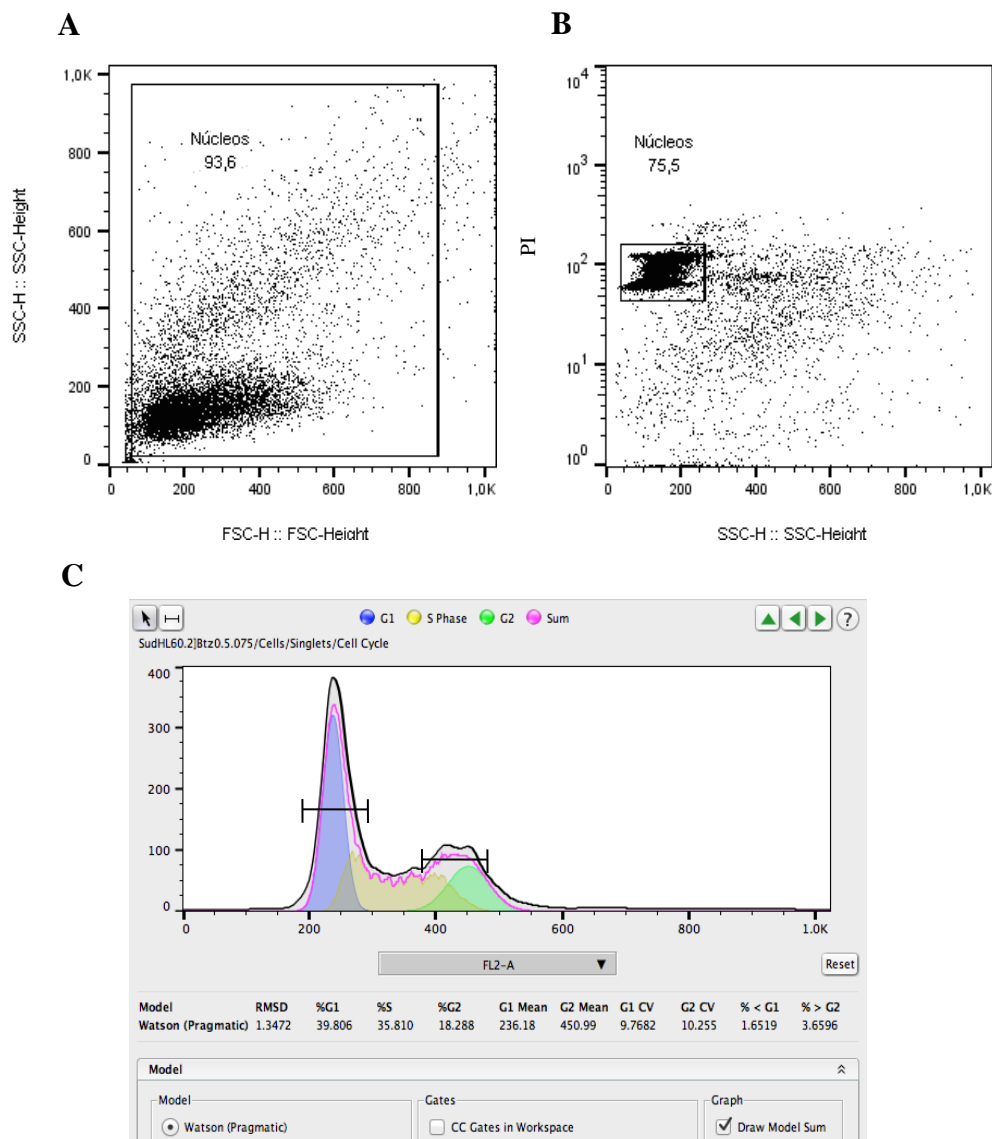


Figura 10-Estratégia utilizada para avaliação do efeito dos extratos etanólicos *P. brasiliensis*, *M. ferruginata* e *A. fastigiatum* e aquosos da *M. ferruginata* em células Jurkat sobre o ciclo celular após 24h de incubação pela técnica citometria de fluxo. A- Seleção da população morfologicamente semelhante utilizando gráficos de distribuição pontual tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). B-Seleção da população presente em um dos quatro estados interfásicos do ciclo celular através de gráficos de distribuição pontual Iodeto de propídeo (FL3H:PI) versus granulosidade celular (SSC-H). C- Determinação do conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA) nas fases Sub G1, S ou G2M mediante o modelo de Watson com o Software FlowJo v.10.0.7.

Para calcular os percentuais das fases Sub G0-G1 foi utilizada uma estratégia “no gate” para não excluir os debris que poderiam conter DNA fragmentado e cujo componente pode ser visualizado em um gráfico de histograma na parte esquerda do pico G0G1. Inicialmente foram realizados gráficos de distribuição pontual como mostrado na Figura 10B. Posteriormente a população de interesse foi analisada mediante histogramas de fluorescência no canal de PI *versus* o número de eventos e finalmente o percentual de eventos correspondentes a fase sub G0-G1 foi calculado fazendo uma seleção da população localizada na esquerda do pico da fase G1 como se mostra na Figura 11:

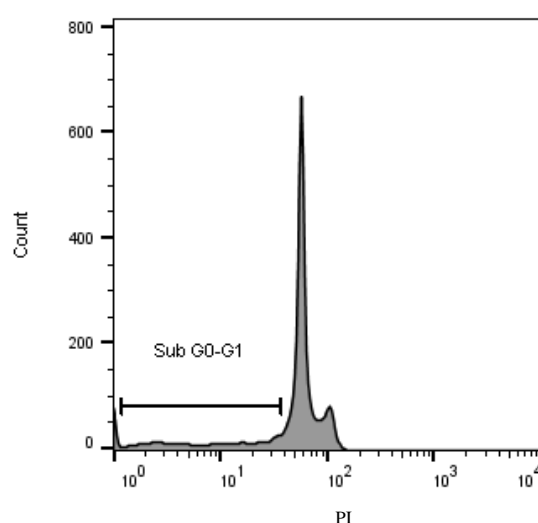


Figura 11-Determinação do conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA) nas fases Sub G0-G1 mediante histogramas em função da intensidade de fluorescência no canal de Iodeto de Propídeo no citômetro de fluxo FACScan.

4.9 Avaliação de eventos apoptóticos e necróticos em células Jurkat tratadas com extratos vegetais

Foi realizado um teste para avaliação dos mecanismos envolvidos com indução de morte celular pelos extratos sobre células Jurkat fazendo uma marcação simultânea com Anexina V e Iodeto de Propídeo (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II - BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA).

Para isso 50µL microlitros de células Jurkat a 2×10^6 células/mL, foram utilizadas para confecção de culturas na ausência (CONT) e na presença dos extratos vegetais Pbf a 200µg/mL, Mfaq e Mfet a 125µg/mL e Afpa a 50µg/mL, concentrações

correspondentes aquelas que se mostraram tóxicas para células Jurkat e não tóxicas para as PBMC. Também foram preparadas culturas contendo PCX a 400nM como controle de morte celular. As culturas foram preparadas em tubos côncavos (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% CO₂ e 95% de umidade. Após esse tempo, as células foram removidas dos tubos por lavagem com 1 mL de PBS, e transferidas para tubos de poliestireno (Falcon 2059, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), seguidas de centrifugação (240 g, 18° C, 7 min). Após a lavagem, foi adicionado 200µL de tampão de ligação (HEPES/NaOH 100mM; pH 7,5; contendo NaCl 1,4M e CaCl₂ 25mM) a 50µL de suspensão celular. Em seguida foram adicionados em cada tubo 2,5µL de conjugado de Anexina V-FITC (Concentração 50µg/mL: Tris-HCl 50mM; pH 7,5; contendo NaCl 100mM) e 5µL de Iodeto de propídeo (Concentração 100µg/mL: Buffer de fosfato de potássio 10mM; pH 7,4; contendo NaCl 150mM). As células foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente ao abrigo de luz. Quando finalizado o período de incubação, as culturas foram avaliadas por citometria de fluxo. Foram obtidos 10000 eventos, em um baixo fluxo de aquisição, com o auxílio do citômetro BD FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Para a aquisição dos dados, foi usado o software CELLQuest e a versão 3.3, enquanto a análise dos dados foi obtida com o auxílio do software FlowJo, versão 10.0.7.

A estratégia de análise utilizada consistiu na produção de gráficos de distribuição pontual de SSC-A versus FSC-A para a seleção da população de estudo (Pop), como mostrado na Figura 12A. Após a seleção da população celular de interesse, foram utilizados gráficos de distribuição pontual de FL3-PI e FL1-H dividido em quatro quadrantes. No quadrante Q4 foi estabelecida a população de células viáveis (Anexina V⁻/PI⁻), no quadrante Q3 (Anexina V⁺/PI⁻) a população de células em apoptose inicial e a porcentagem de células presentes no quadrante Q2 correspondeu à população de células em apoptose tardia ou necrose (Anexina V⁺/PI⁺) Figura 12B.

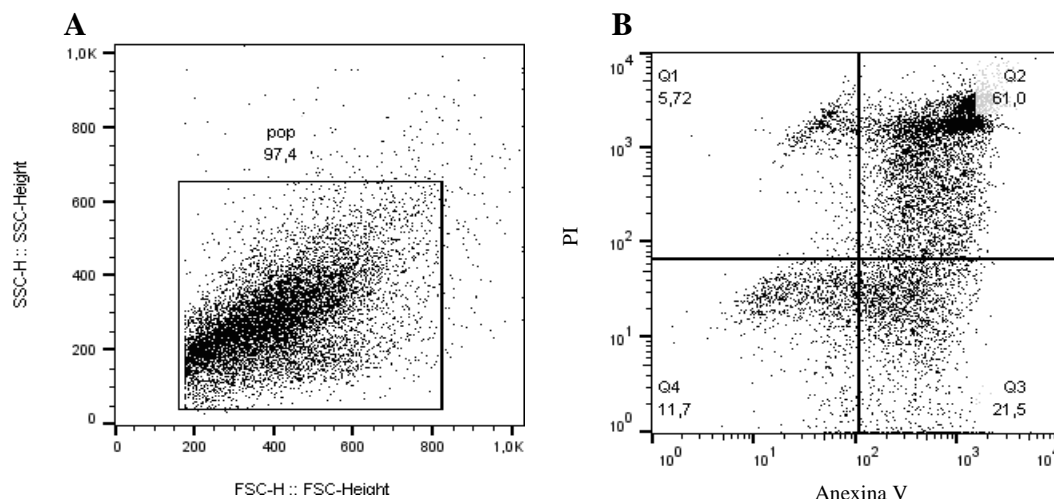


Figura 12-Estratégia utilizada para avaliação da atividade apoptótica e necrótica dos extratos etanólicos *P. brasiliensis*, *M. ferruginata* e *A. fastigiatum* e aquosos da *M. ferruginata* sobre células Jurkat após 24h de incubação celular pela técnica de citometria de fluxo. A- Seleção da população morfológicamente semelhante utilizando gráficos de distribuição pontual tamanho (FSC) *versus* granulividade (SSC). **B-** Análise dos “Dot-plots” mediante gráficos de distribuição pontual Annexina V *versus* Iodeto de propídeo (PI) para a determinação da porcentagem de população de células viáveis (Q4), células em apoptose inicial (Q3) ou apoptose (Q2) tardia ou necrose (Q1) Dados adquiridos no citômetro de fluxo FACSCan. Análise dos dados por meio do software FlowJo, versão 10.0.7.

4.10 Análises estatísticas

Inicialmente foi realizada a análise da normalidade dos dados (Shapiro Wilk). Todos os dados apresentaram distribuição simétrica.

Para as análises dos dados de citotoxicidade e avaliação do mecanismo de morte celular, utilizou-se o teste de *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey (*post test*). Não foi o foco do presente trabalho mostrar o efeito do tempo de cultura sobre eventos avaliados. Os dados estatísticos obtidos pela análise de ANOVA foram indicados apenas com relação aos tipos celulares (Jurkat ou PBMC).

Para análise dos dados do ciclo celular usou-se o teste *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni (*post test*). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e as diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $p \leq 0,05$. O *software* utilizado foi o GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1. Análise dos hemogramas dos sujeitos da pesquisa

Os voluntários participantes da pesquisa foram analisados usando como referência os parâmetros hematológicos de normalidade. De acordo com os dados obtidos, os voluntários apresentaram hemograma dentro dos limites da normalidade para indivíduos adultos como se apresenta na Tabela 6:

Tabela 6-Caracterização dos voluntários

Parâmetros (valores de referência)*	Média \pmDP
Neutrófilos (40-70%)	56 \pm 5%
Linfócitos (20-50%)	38 \pm 5%
Monócitos (2-20%)	2 \pm 1%
Eosinófilos (0-8%)	4 \pm 3%
Basófilos (0-3%)	0 \pm 0%

*Valores de referência de acordo com Xavier et al (2010).

5.2. Análise *in vitro* do efeito citotóxico de DMSO sobre células Jurkat após 24h, 48h e 72h de tratamento

Tendo em vista que o DMSO seria a substância utilizada na diluição dos extratos vegetais para todos os experimentos, foi necessário identificar a faixa ótima de DMSO que não comprometesse a viabilidade das células Jurkat. Para isto, foi avaliada a toxicidade desse solvente sobre as Jurkat utilizando diferentes concentrações e distintos tempos de incubação. Os resultados foram expressos em termos de viabilidade de celular como se mostra na Figura 13.

Após 24 h e 48h de cultura, o DMSO na concentração igual ou inferior a 2 %, não induziu efeito citotóxico às Jurkat (Após 24h de tratamento: 1%: 98,15 \pm 0,45%; 2%: 96,70 \pm 1,17%; após 48h de tratamento: 1%: 98,70 \pm 0,08%; 2%: 91,98 \pm 6,19%) quando comparado às culturas controle (Após 24h de tratamento: 98,08 \pm 0,99%; após 48h de tratamento: 98,63 \pm 0,42%) e controle de morte celular Paclitaxel (Após 24h: PCX: 13,06 \pm 6,63%; após 48h: 3,53 \pm 3,42%). Porém, nas culturas tratadas com 4 e 8% de DMSO houve significativa redução da viabilidade celular (Após 24h: 4%: 72,78 \pm

4,83%; 8%: $43,48 \pm 7,09\%$; após 48h: 4%: $23,44 \pm 13,99\%$; 8%: $2,63 \pm 3,22\%$). Após 72h de incubação, nas culturas tratadas com DMSO foi verificado uma diminuição na viabilidade celular a partir de 2% (2%: $83,69 \pm 0,22\%$; 4%: $8,155 \pm 1,84\%$; 8%: $0,46 \pm 0,54\%$), quando comparado às culturas controle ($99,28 \pm 0,33\%$) e controle com PCX($8,073 \pm 6,63\%$).

Diante dos resultados obtidos, todas as culturas realizadas nos experimentos subsequentes, o uso do DMSO como solvente ocorreu sem que o mesmo ultrapassasse a concentração final de 1% v/v nas culturas celulares. Esse procedimento preservou a viabilidade das células em estudo.

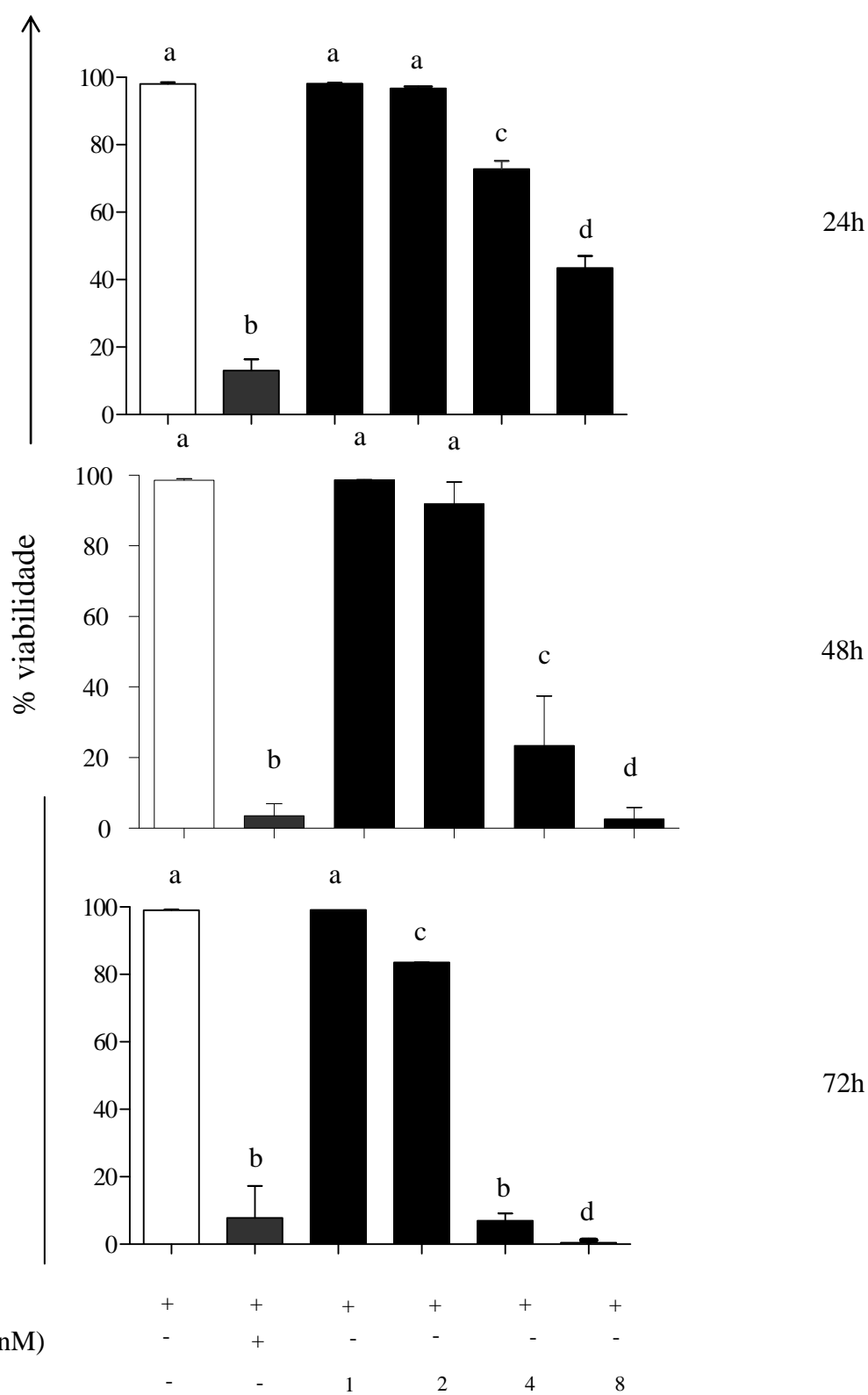


Figura 13-Percentual de Jurkat viáveis após tratamento com DMSO durante 24, 48 ou 72h (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c” e “d” para as comparações em relação às culturas Controle (CONT), Paclitaxel (PCX) ou 4%v/v e 8%v/v de Dimetilsulfóxido (DMSO) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA one-way com *post hoc* de Tukey.

5.3. Comparação do efeito citotóxico dos extratos PBf, Mfet, Mfaq e Afpa entre PMBC e células Jurkat após 24h, 48h e 72h de tratamento

Com o intuito de investigar se as concentrações dos extratos PBf, Mfet, Mfaq e Afpa, não tóxicas às PBMC, seriam tóxicas para células Jurkat, o efeito citotóxico desses extratos vegetais foi investigado nos dois tipos de células após de 24h, 48h e 72h de tratamento. Os resultados estão representados nas Figuras 14, 15, 16 e 17.

5.3.1 Extrato etanólico *Pseudobrickellia brasiliensis* (folhas)

A Figura 14 representa a análise do percentual de PBMC e Jurkat viáveis incubadas com o extrato etanólico de folhas de *P. brasiliensis*(PBf), nas concentrações de 100µg/mL e 200µg/mL, após 24h, 48h e 72h de cultura. Após 24h de tratamento, os resultados indicaram que o extrato PBf à 100µg/mL não reduziu a viabilidade das Jurkat quando comparado com a viabilidade nas culturas de PBMC (PBMC: $98,50 \pm 1,41\%$; Jurkat: $96,75 \pm 2,22\%$). No entanto, na concentração de 200µg/mL foi observada uma diminuição significativa na viabilidade de células Jurkat quando comparada com as culturas de PBMC (PBMC: $90,50 \pm 6,75\%$; Jurkat: $54,60 \pm 9,55\%$). Após 48h de tratamento, na concentração de 100µg/mL do extrato, foi observada uma diminuição no percentual de PBMC viáveis em relação às células Jurkat (PBMC: $85,05 \pm 3,90\%$; 48h Jurkat: $93,98 \pm 5,65\%$) o mesmo comportamento se observou após 72h de incubação (PBMC: $78,73 \pm 6,77\%$; Jurkat: $93,65 \pm 2,49\%$). Na concentração de 200µg/mL, após 48h e 72h de tratamento, o extrato apresentou-se tóxico para ambas as linhagens (PBMC: $33,05 \pm 7,29\%$; Jurkat : $24,53 \pm 11,87\%$), como a 72h de incubação (PBMC: $23,65 \pm 7,34\%$; Jurkat : $17,55 \pm 1,56\%$). Não houve diferença entre o percentual de viabilidade entre Jurkat e PBMC nas culturas controle.

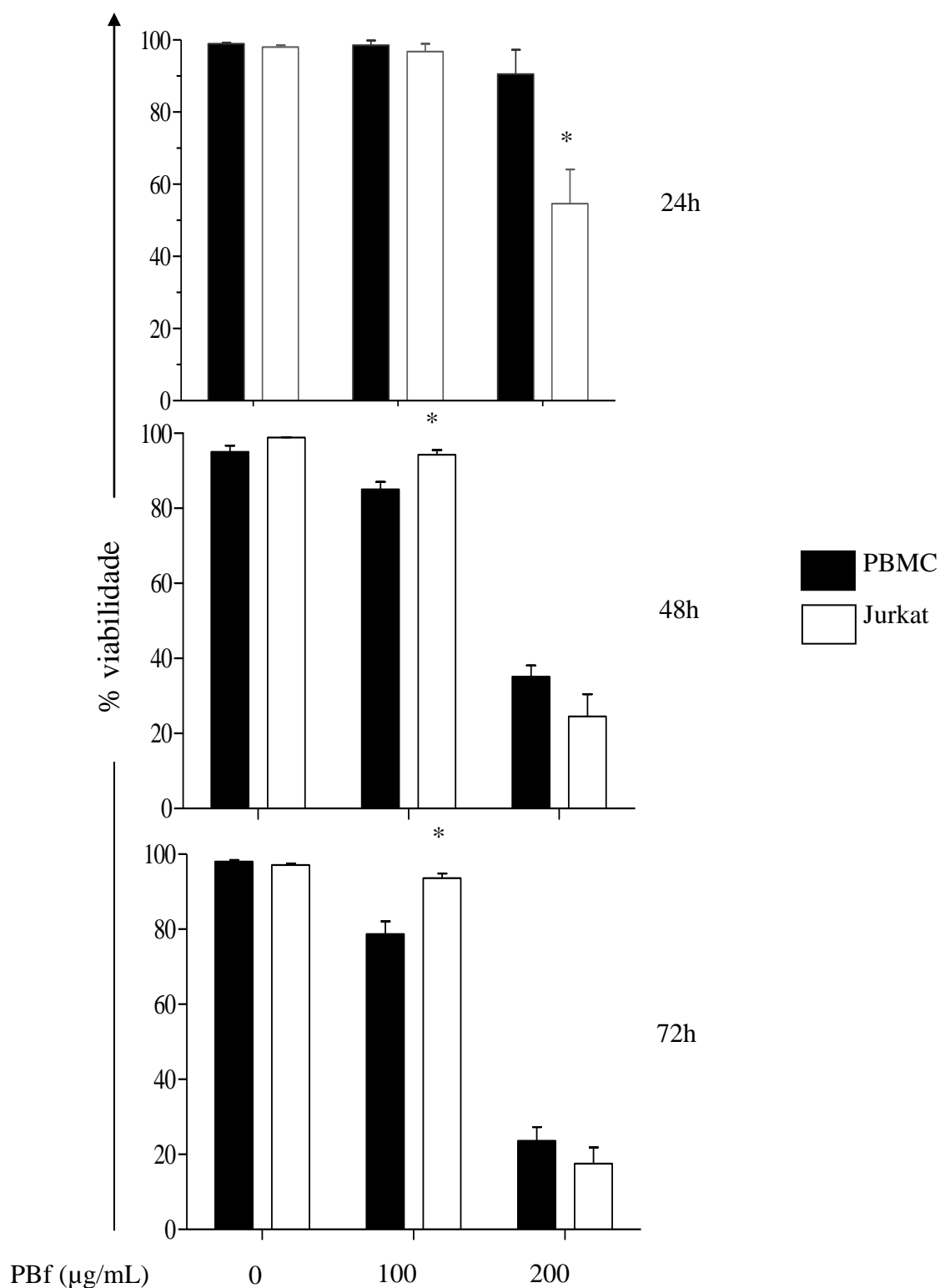


Figura 14-Percentual de Jurkat ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC) viáveis após tratamento com *P. brasiliensis* durante 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * Indica diferença significativa em relação às culturas de células mononucleares do sangue periférico tratadas com extrato ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com post hoc Bonferroni.

5.3.2 Extrato etanólico *Miconia ferruginata* (caule)

A Figura 15 ilustra que o extrato etanólico da *M. ferruginata* em todas as concentrações utilizadas apresentou maior toxicidade às células Jurkat após 24h (31,2µg/mL: $85,00 \pm 1,83\%$; 62,5µg/mL: $36,75 \pm 1,89\%$; 125µg/mL: $3,75 \pm 1,83\%$), 48h (31,2µg/mL: $83,75 \pm 1,50\%$; 62,5µg/mL: $18,75 \pm 4,19\%$; 125µg/mL: $1,50 \pm 1,29\%$) e 72h (31,2µg/mL: $73,75 \pm 2,99\%$; 62,5µg/mL: $15,25 \pm 2,06\%$; 125µg/mL: $0,75 \pm 0,50\%$) quando comparado às PBMC, após 24h (31,2µg/mL: $91,75 \pm 0,96\%$; 62,5µg/mL: $89,75 \pm 0,96\%$; 125µg/mL: $67,00 \pm 2,16\%$), 48h (31,2µg/mL: $90,25 \pm 2,06\%$; 62,5µg/mL: $70,25 \pm 6,40\%$; 125µg/mL: $57,25 \pm 2,06\%$) e 72h de tratamento (31,2µg/mL: $77,50 \pm 2,08\%$; 62,5µg/mL: $61,00 \pm 3,27\%$; 125µg/mL: $40,00 \pm 4,24\%$). Cabe ressaltar que não houve diferença entre o percentual de células Jurkat nem PBMC nas culturas controle.

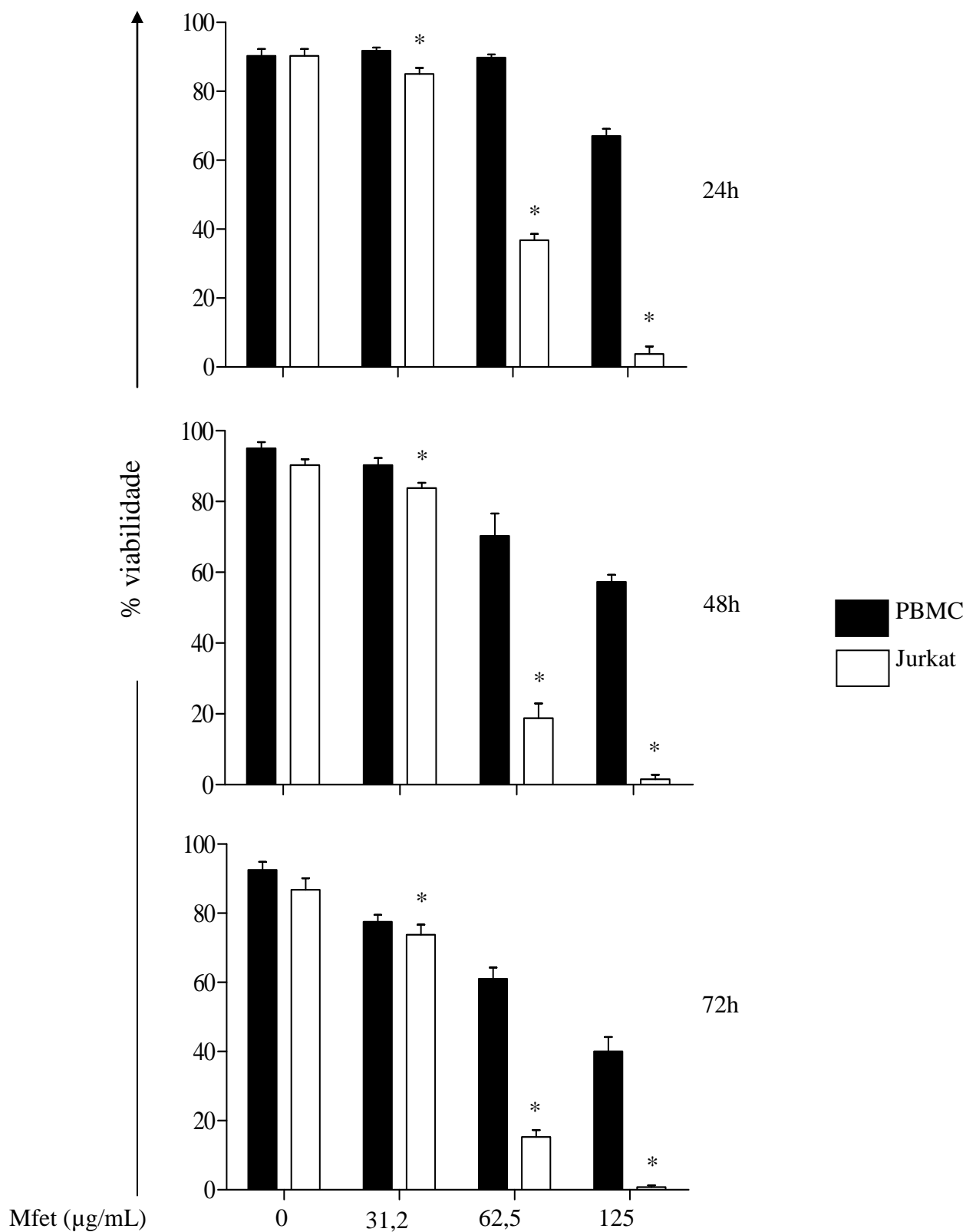


Figura 15-Percentual de Jurkat ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC) viáveis após tratamento com *M. ferruginata* durante 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * Indica diferença significativa em relação às culturas de células mononucleares do sangue periférico tratadas com extrato ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Bonferroni.

5.3.3 Extrato aquoso *Miconia ferruginata* (caule)

De maneira semelhante ao observado para o extrato etanólico, o extrato aquoso de *M. ferruginata*, em todas as concentrações avaliadas, reduziu significativamente a viabilidade de células Jurkat, após 24h (31,2µg/mL:84,50 ± 3,42%; 62,5µg/mL:37,00 ± 1,41%; 125µg/mL:0,75 ± 0,50%), 48h (31,2µg/mL:81,00 ± 2,60%; 62,5µg/mL:30,50 ± 11,27%; 125µg/mL:0,00 ± 0,00%) e 72h (31,2µg/mL:73,75 ± 2,63%; 62,5µg/mL:13,25 ± 3,30%; 125µg/mL: 0,00 ± 0,00%) de incubação, quando comparado com às PBMC tratadas com os extratos e incubadas por 24h (31,2µg/mL: 91,25 ± 1,50%; 62,5µg/mL:89,00 ± 1,83%; 125µg/mL:73,25 ± 7,35%), 48h (31,2µg/mL : 91,50 ± 1,91%; 62,5µg/mL:71,25 ± 6,80%; 125µg/mL:58,25 ± 3,60%), e 72h(31,2µg/mL :88,00 ± 3,16%; 62,5µg/mL:64,75 ± 6,29%; 125µg/mL:36,75 ± 2,50%). Não houve diferença entre nos percentuais de viabilidade entre Jurkat e PBMC nas culturas controle.

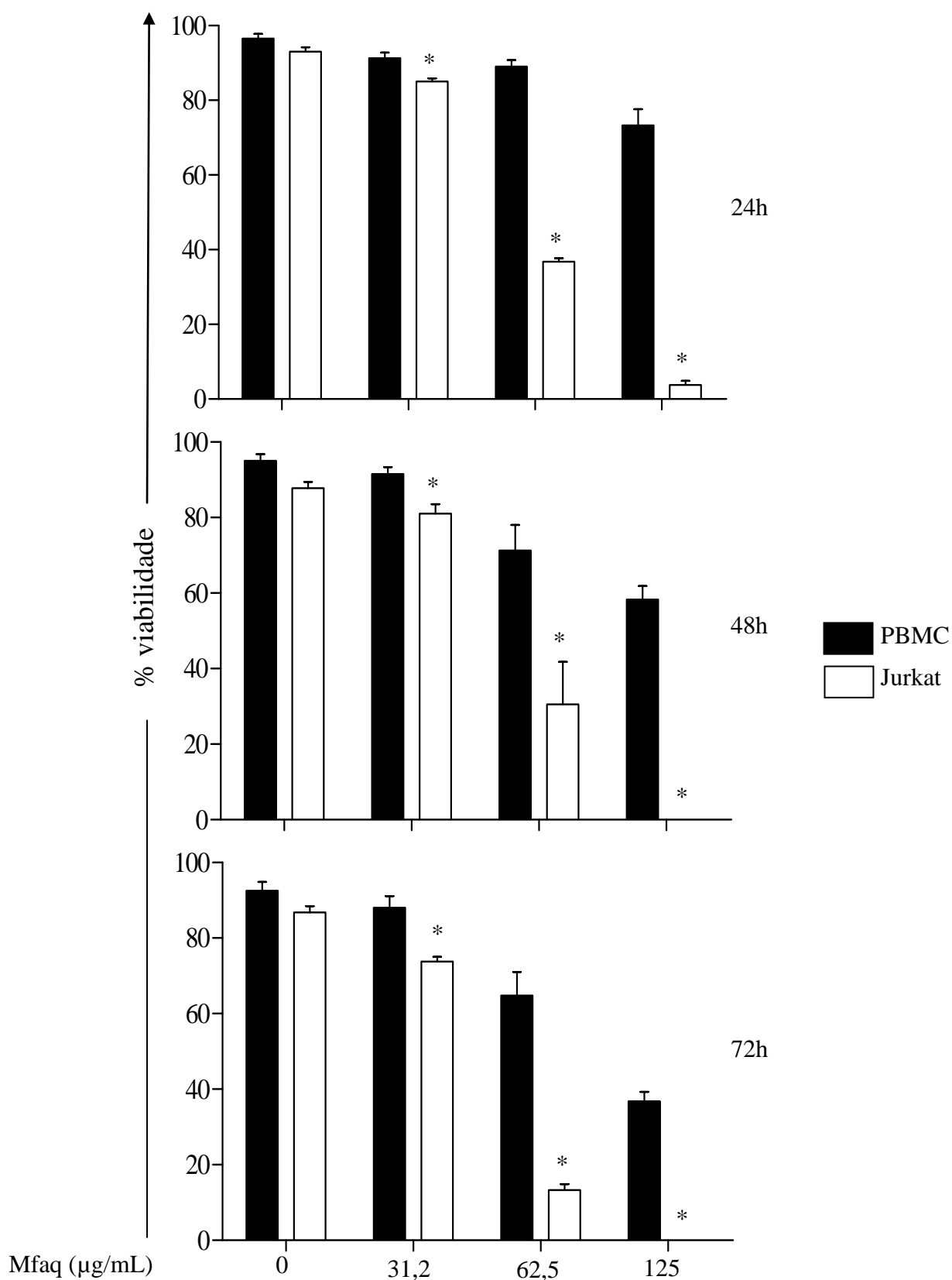


Figura 16- Percentual de Jurkat ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC) viáveis após tratamento com *M. ferruginata* durante 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * Indica diferença significativa em relação às culturas de células mononucleares do sangue periférico tratadas com extrato ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Bonferroni.

5.3.4 Extrato etanólico *Ageratum fastigiatum* (partes aéreas)

Os resultados da Figura 17 indicam que após de 24h se evidenciou uma diminuição na porcentagem de viabilidade células Jurkat (12,5µg/mL: $84,00 \pm 4,08\%$; 25µg/mL: $75,00 \pm 4,08\%$; 50µg/mL: $12,25 \pm 5,68\%$) em todas as concentrações quando comparado com as culturas com PBMC (12,5µg/mL: $96,00 \pm 3,46\%$; 25µg/mL: $94,00 \pm 2,16\%$; 50µg/mL: $93,00 \pm 2,16\%$). Por outra parte, se observou que após 48h, nas concentrações a partir de 25µg/mL houve uma perda na viabilidade celular de Jurkat (25µg/mL: $70,00 \pm 2,16\%$; 50µg/mL: $7,50 \pm 3,87\%$) quando comparado com as PBMC (25µg/mL: $83,00 \pm 4,83\%$; 50µg/mL: $59,50 \pm 3,00$). Do mesmo jeito, após 72h evidenciou-se uma diminuição significativa da viabilidade das Jurkat (25µg/mL: $58,50 \pm 3,32\%$; 50µg/mL: $0,50 \pm 1,00$) quando os valores foram comparados com as culturas com PBMC (25µg/mL: $66,50 \pm 1,73\%$; 50µg/mL: $36,75 \pm 2,50$). As viabilidades na concentração de 12,5µg/mL, após 48h e 72h de incubação foram semelhantes, ao igual que os percentuais de células viáveis entre os grupos controle dos dois grupos analisados.

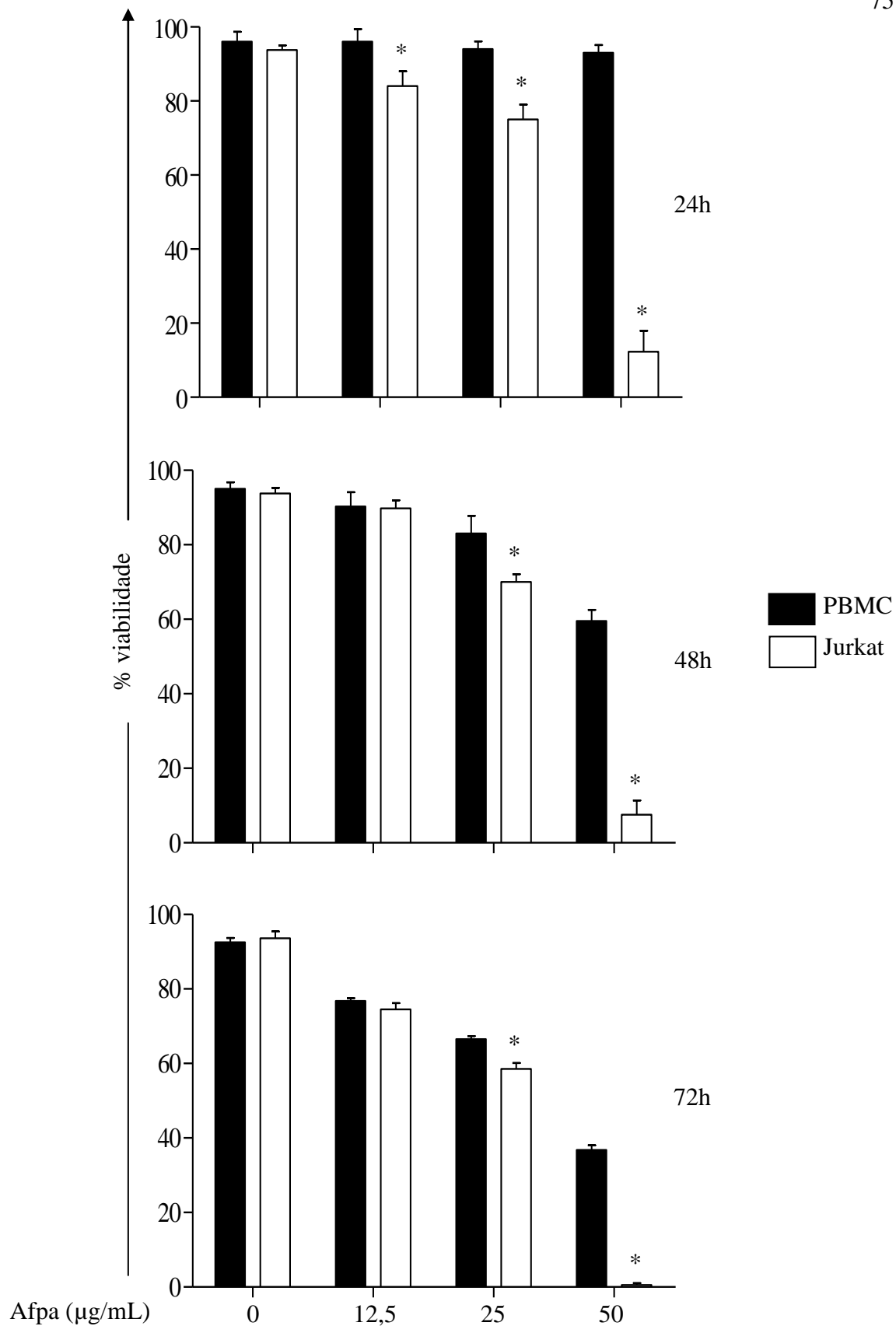


Figura 17- Percentual de Jurkat ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC) viáveis após tratamento com *A. fastigiatum* durante 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * Indica diferença significativa em relação às culturas de células mononucleares do sangue periférico tratadas com extrato ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Bonferroni.

5.4 Obtenção dos índices de seletividade dos extratos a partir dos valores de LC₅₀ de Jurkat e PBMC, e cálculo das porcentagens de erro entre os índices de toxicidade teórico e experimental dos extratos sobre células Jurkat

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade celular, foi possível calcular o LC₅₀ dos extratos avaliados em função ao tempo de tratamento (24h, 48h e 72h) tanto para as Jurkat como para PBMC. Para isto, os dados foram analisados pelo método de regressão linear, utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Uma vez calculado os LC₅₀ dos extratos sobre as Jurkat foi comprovado experimentalmente se valores teóricos calculados promoviam a morte celular em 50% das células Jurkat, em cada um dos tempos de incubação. Vale ressaltar que os valores teóricos de LC₅₀ dos extratos sobre as PBMC não foram verificados experimentalmente. Os valores de LC₅₀ obtidos também foram utilizados para o cálculo do índice de seletividade (IS) dos extratos, em cada um dos tempos de incubação, utilizando-se a seguinte equação matemática:

$$IS = \frac{\text{Concentração que inibe o 50\% células normais}}{\text{Concentração que inibe o 50\% células tumorais}}$$

$$IS > 2$$

Valores de IS acima de 2 são considerados seletivos. Os resultados obtidos se encontram reportados na Tabela 7:

Tabela 7- Valores das concentrações letais e índices de seletividade dos extratos sobre as Jurkat e células PBMC em todos os tempos de incubação.

Extrato	Tempo de incubação (horas)	Concentração Letal Teórica (CLT ₅₀) sobre Jurkat (µg/mL)	Percentual de citotoxicidade de Jurkat (%) aplicando-se a CLT ₅₀	% Erro entre a porcentagem teórica e experimental inibida pelo LC ₅₀ sobre Jurkat	Concentração o letal (LC ₅₀) sobre PBMC(µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
<i>P.brasilensis</i>	24	200	42	16	1187	5,94
	48	160	47	6	172	1,08
	72	148	51	2	146	0,98
<i>M. ferruginata etanólico</i>	24	61	41	18	207	3,39
	48	53	42	16	143	2,70
	72	47	48	4	97	2,06
<i>M. ferruginata aquoso</i>	24	60	57	14	256	4,27
	48	55	59	18	147	2,67
	72	47	61	22	99	2,11
<i>A. fastigiatum</i>	24	32	45	10	697	21,78
	48	31	57	14	66	2,13
	72	27	55	10	38,43	1,42

De acordo com os resultados da Tabela 7, é possível notar que a utilização da concentração de LC₅₀ teórico sobre as culturas de células Jurkat produziram valores de viabilidade muito próximos do esperado. Além disso, a maioria dos extratos apresentaram índices de seletividades superiores a 2, indicando que citotoxicidade é seletiva para células Jurkat.

5.5 Análise da eficácia dos extratos PBf, Mfet, Mfaq e Afpa na morte seletiva de células Jurkat após 24h, 48h e 72h de tratamento, quando comparado ao fármaco antitumoral Paclitaxel

Com os resultados de citotoxicidade inicialmente foi feita uma análise do efeito citotóxico dos extratos PBf, Mfet, Mfaq e Afpa em cada uma das concentrações utilizadas ao decorrer do tempo de tratamento, para avaliar a relação entre concentração e tempo de resposta.

Além da análise de citotoxicidade dos extratos PBf, Mfet, Mfaq e Afpa, em diferentes concentrações e diferentes tempos de tratamento, e mediante os índices de

seletividade encontrados para a toxicidade sobre células Jurkat, avaliamos também a eficácia de cada um dos extratos, em diferentes concentrações e em diferentes tempos de tratamento e comparamos ao fármaco antineoplásico Paclitaxel a 400nM. Os resultados se encontram representados nos gráficos 18, 19, 20 e 21.

5.5.1 Extrato etanólico *Pseudobrickellia brasiliensis* (folhas)

Os resultados de citotoxicidade dos extratos *P. brasiliensis* e do fármaco Paclitaxel sobre Jurkat, variando-se tempo de incubação e concentração estão representados na Figura 18. Diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$, ANOVA com *post hoc* de Tukey) na comparação das diferentes culturas foram identificadas pelas letras “a”, “b” e “c”.

O extrato PBF a 100µg/mL não promoveu diferenças nos valores de viabilidade das células Jurkat quando comparados os três tempos de incubação. No entanto, o extrato PBF na concentração de 200µg/mL produziu uma diminuição da viabilidade das Jurkat em todos os tempos avaliados, com destaque para o tempo de 72h onde a citotoxicidade foi de quase 100%.

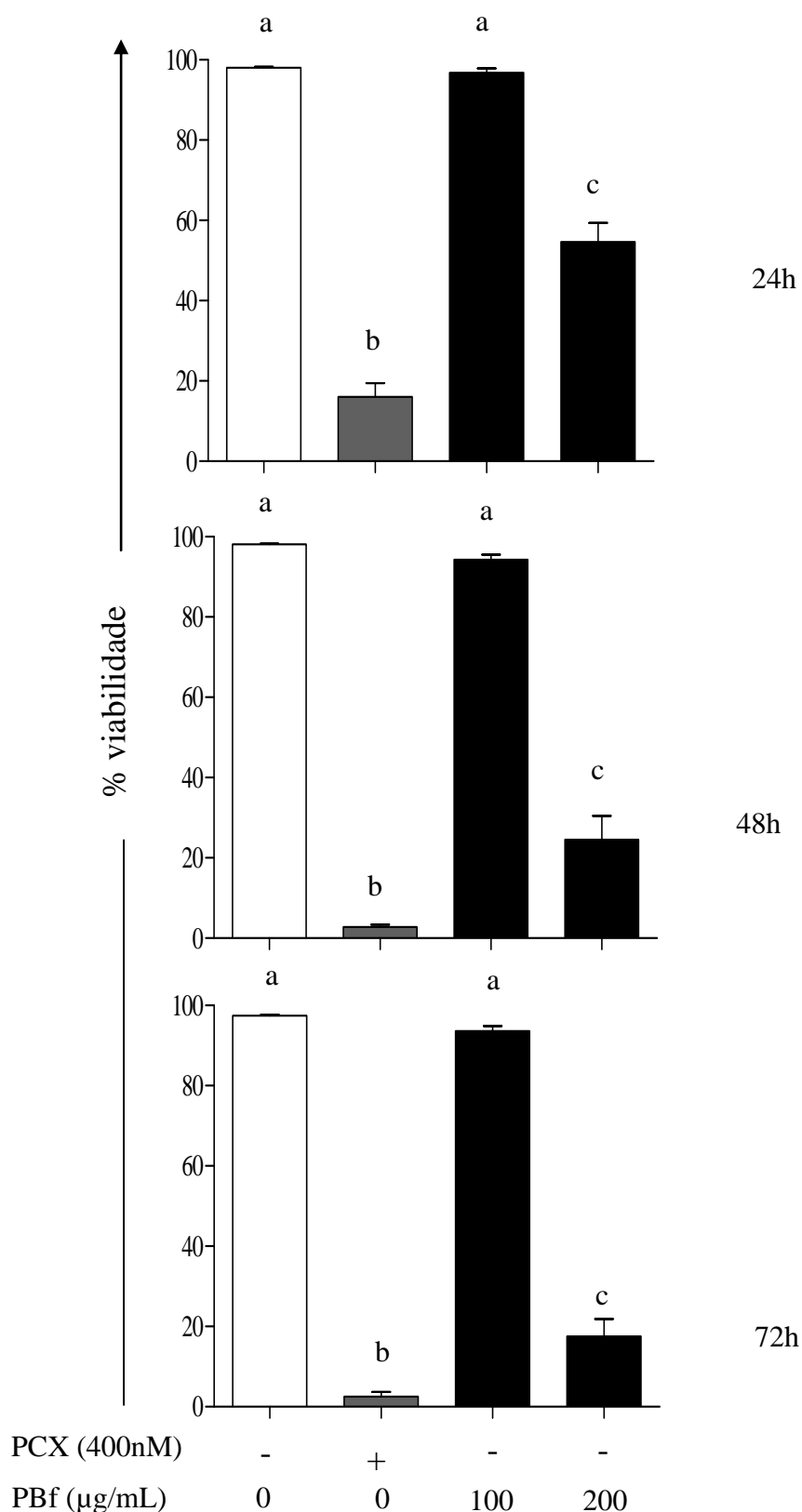


Figura 18-Percentual de Jurkat viáveis tratadas com o extrato etanólico *P. brasilensis* após 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças são identificadas pelas letras “a”, “b” e “c”, para as comparações entre às culturas *P. brasilensis* (0µg/mL), Paclitaxel (PCX), *P. brasilensis* (200µg/mL) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Tukey.

Os resultados obtidos foram expressos como valores de toxicidade para calcular a eficácia do extrato em cada concentração. Os valores estão apresentadas na Tabela 8, como se observa a continuação:

Tabela 8- Valores de eficácia do extrato *P. brasiliensis* em cada uma das concentrações e tempos de incubação sobre células Jurkat

% Eficácia <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>			
Concentração (µg/mL)	24h	48h	72h
100	3,86	5,83	6,51
200	54,07	77,62	85,28

Conforme observado na tabela 8, de maneira geral, houve um aumento da eficácia do extrato à medida que foram utilizados concentrações e tempos de tratamento maiores. Destaca-se a alta eficácia (85,28%) para a concentração de 200µg/mL para o extrato *P.brasiliensis*, após 72h de tratamento.

5.5.2 Extrato etanólico *Miconia ferruginata* (caule)

A Figura 19 ilustra os valores de citotoxicidade dos extratos *M. ferruginata* e do fármaco padrão PCX sobre células Jurkat após de 24h, 48h e 72h de tratamento. Diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$, ANOVA com *post hoc* de Tukey) na comparação das diferentes culturas foram identificadas pelas letras “a”, “b” e “c”.

O extrato Mfet em todas as concentrações produziu diminuição da viabilidade das células Jurkat em todos os tempos de incubação. No entanto, na concentração de 125µg/mL o extrato mostrou maior citotoxicidade quando comparado com as outras concentrações, com destaque para os tempos de 48h e 72h onde a citotoxicidade foi de quase 100%.

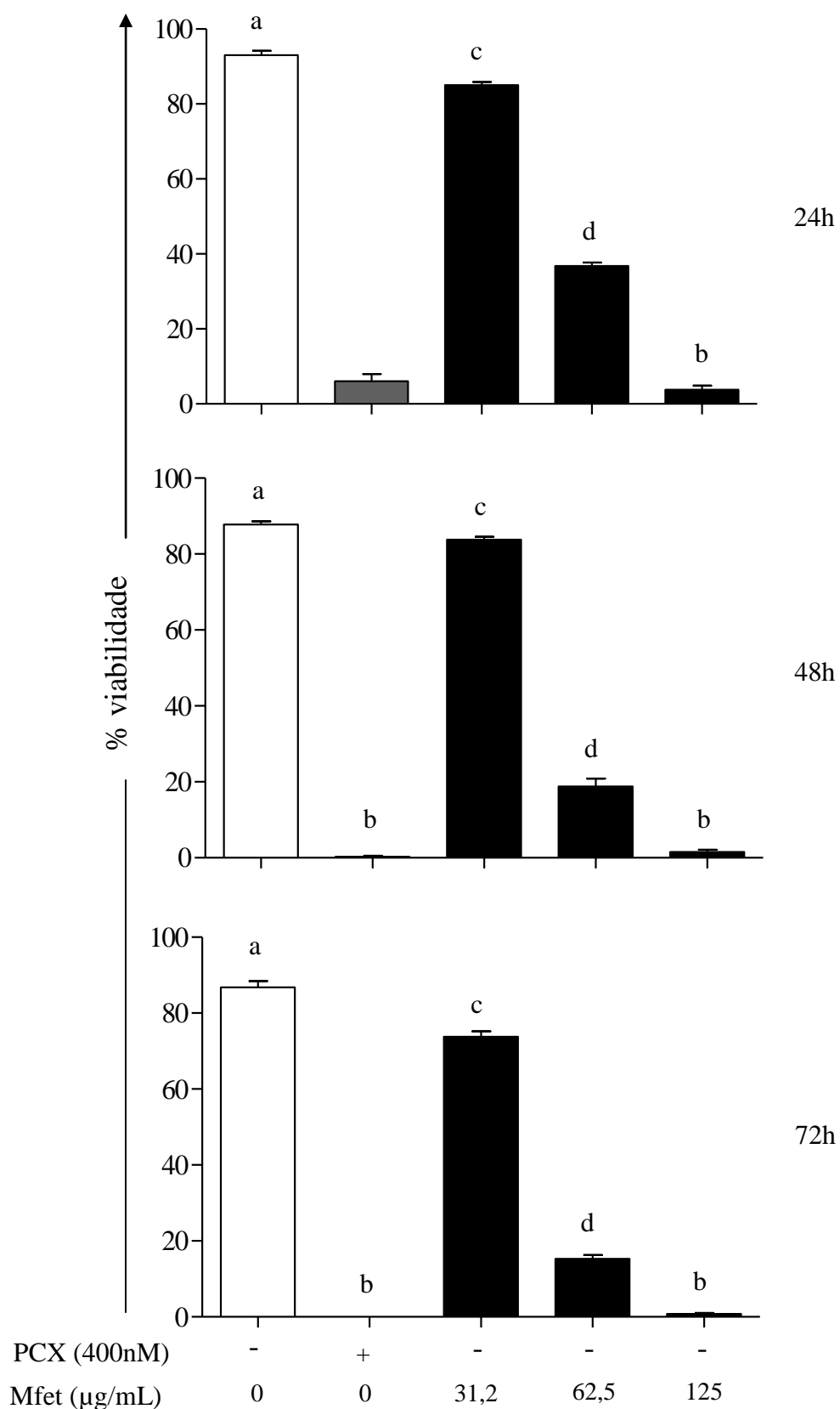


Figura 19- Percentual de Jurkat viáveis tratadas com o extrato etanólico *M. ferruginata* após 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c”, e “d”, para as comparações entre às culturas *M. ferruginata* (0μg/mL), Paclitaxel (PCX), *M. ferruginata* a 31,2μg/mL, 62,5μg/mL e 125 μg/mL respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Tukey.

Os percentuais de eficácia dos extratos em comparação ao fármaco PCX foram calculados a partir dos valores de viabilidade expressados em porcentagem de toxicidade, como se apresentam na Tabela 9:

Tabela 9-Valores de eficácia do extrato etanólico *M. ferruginata* em cada uma das concentrações e tempos de incubação sobre células Jurkat.

% Eficácia <i>Miconia ferruginata</i> (etanólico)			
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	24h	48h	72h
31,2	16	16,29	26,25
62,5	67,28	81,5	84,75
125	102	99	99,25

De acordo com os dados mostrados na Tabela 9, de maneira geral, evidenciou-se um aumento da eficácia do extrato nas culturas tratadas com maiores concentrações. Destacando-se a eficácia do extrato *M. ferruginata* na concentração 125 $\mu\text{g/mL}$ após de 24h de tratamento onde se obteve uma eficácia (102%) maior a eficácia apresentada pelo fármaco antitumoral PCX.

5.5.3 Extrato aquoso *Miconia ferruginata* (caule)

Na Figura 20 estão representados os valores de citotoxicidade dos extratos *M. ferruginata* e do fármaco PCX sobre células Jurkat após de 24h, 48h e 72h de tratamento. Diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$, ANOVA com *post hoc* de Tukey) na comparação das diferentes culturas foram identificadas pelas letras “a”, “b” e “c”.

O extrato aquoso da *M. ferruginata* apresentou um comportamento semelhante que o extrato etanólico, já que diminuiu a viabilidade das Jurkat nos tempos e concentrações maiores, destacando-se a concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ após de 48h e 72h de tratamento onde se obteve valores de citotoxicidade de 100%.

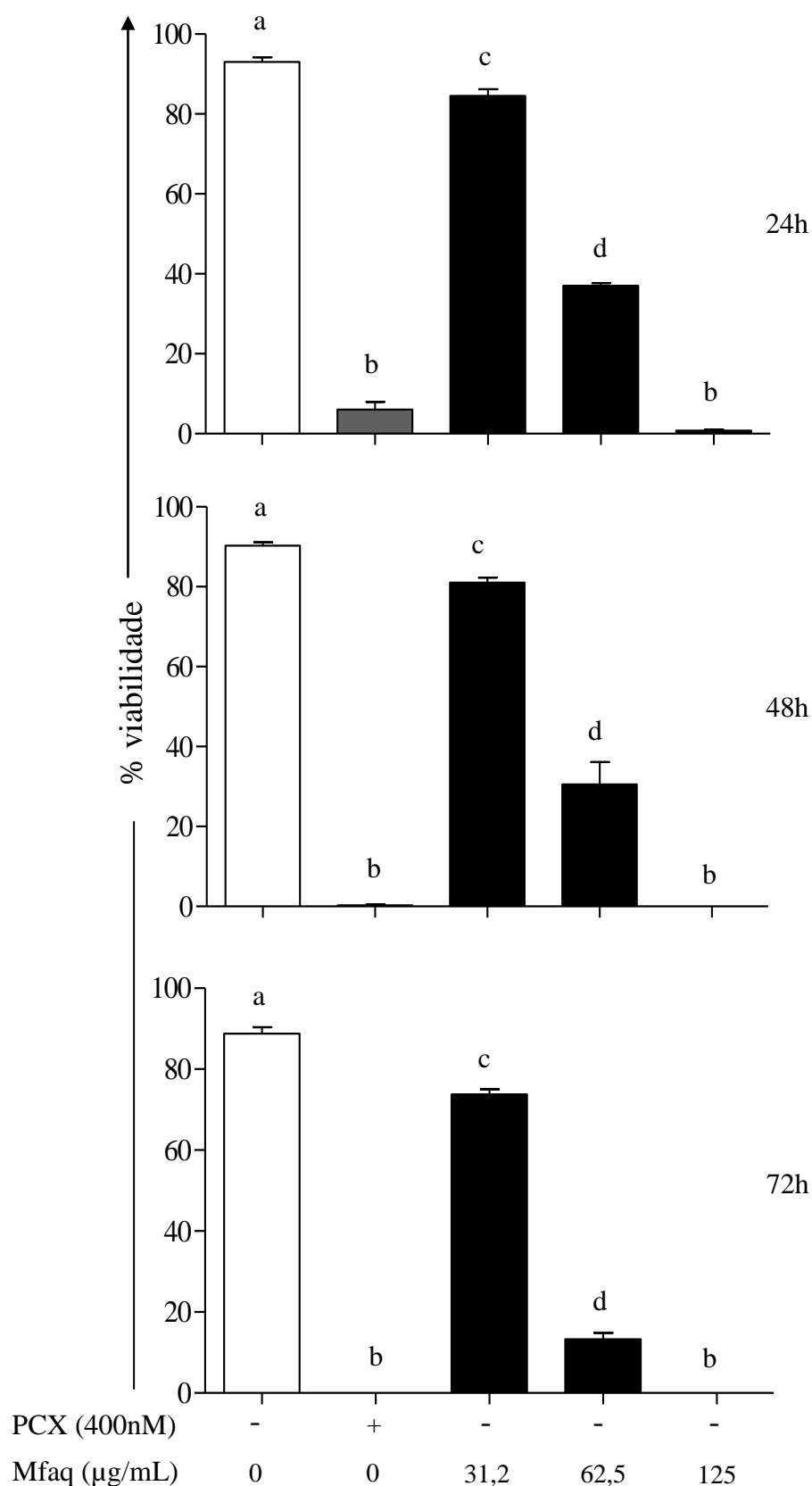


Figura 20- Percentual de Jurkat viáveis tratadas com o extrato aquoso *M. ferruginata* após 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c”, ou “d”, para as comparações entre às culturas *M. ferruginata* (0μg/mL), Paclitaxel (PCX), *M. ferruginata* a 31,2μg/mL, 62,5μg/mL e 125 μg/mL respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Tukey.

Os valores de eficácia em todas as concentrações dos extratos aquosos após 24h, 48h e 72h de tratamento foram calculados a partir dos percentuais de viabilidade expressados como valores de citotoxicidade, como se mostra na tabela 10:

Tabela 10- Valores de eficácia do extrato aquoso *M. ferruginata* em cada uma das concentrações e tempos de incubação sobre células Jurkat.

% Eficácia <i>Miconia ferruginata</i> (aquoso)			
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	24h	48h	72h
31,2	16,48	19,04	26,25
62,5	67,02	70	86,75
125	105,6	100,25	100

Os resultados ilustrados na Tabela 10 mostraram que a eficácia dos extratos aquosos da Mfaq aumentou nas concentrações maiores ao igual que os valores obtidos no extrato etanólico. Destacando os valores de eficácia na concentração de $125\mu\text{g/mL}$: 105,6%, 100,25% e 100% após de 24h, 48h e 72h de tratamento respectivamente.

5.5.4 Extrato etanólico *Ageratum fastigiatum* (partes aéreas)

Na Figura 21 estão ilustrados os valores de citotoxicidade dos extratos *A. fastigiatum* do fármaco antitumoral PCX sobre células Jurkat em todos os tempos de tratamento. Diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$, ANOVA com *post hoc* de Tukey) na comparação das diferentes culturas foram identificadas pelas letras “a”, “b” e “c”.

Os resultados demonstram que os extratos da *A. fastigiatum* promoveram a perda de viabilidade das células Jurkat principalmente na concentração de $50\mu\text{g/mL}$ após 72 h de tratamento onde a citotoxicidade foi de quase 100%.

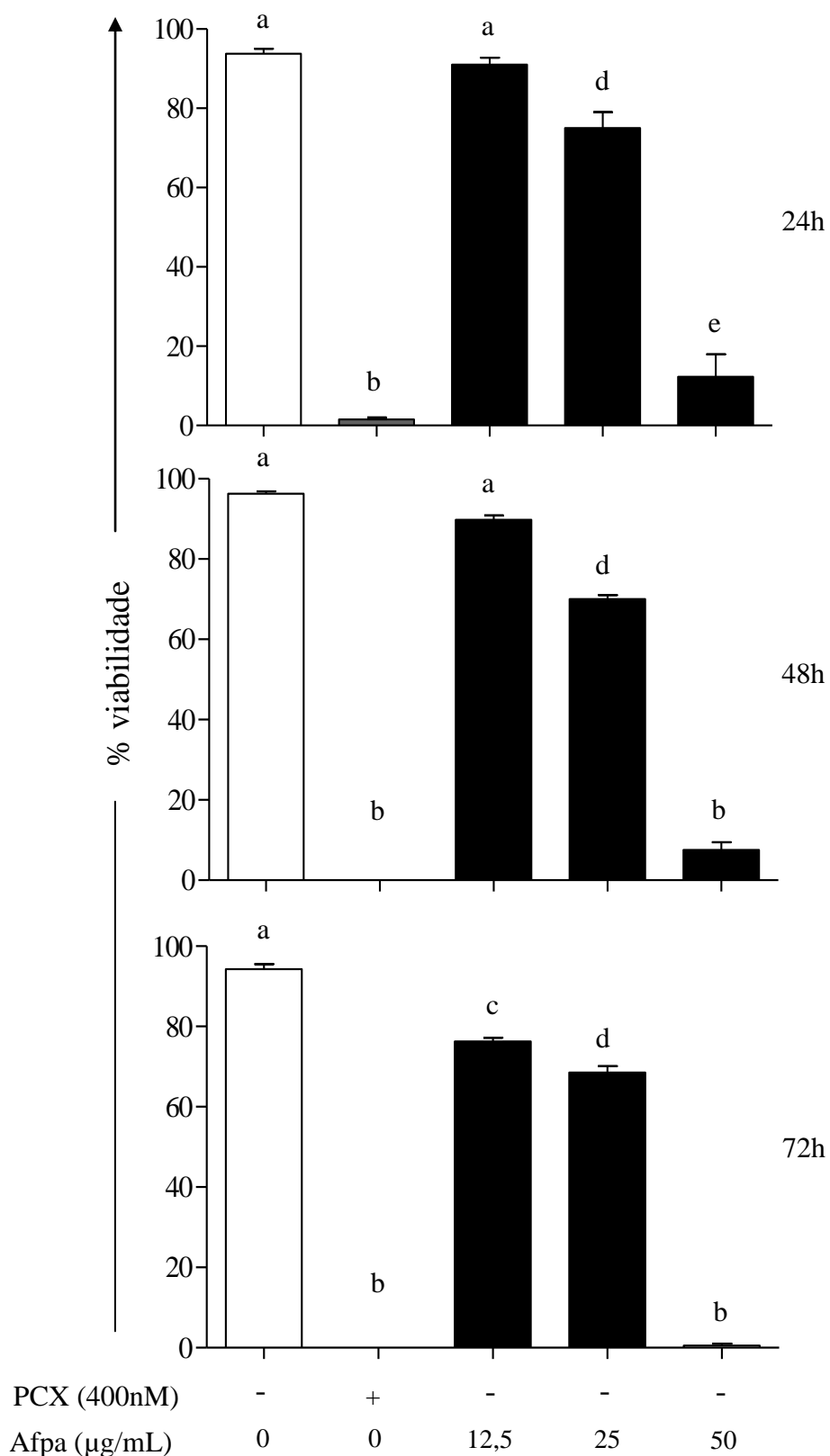


Figura 21-Percentual de Jurkat viáveis tratadas com o extrato etanólico *A. fastigiatum* após 24, 48 ou 72h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c”, “d” ou “e”, para as comparações entre às culturas *A. fastigiatum* (0µg/mL), Paclitaxel (PCX), *A. fastigiatum* a 12,5µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA two-way com *post hoc* Tukey.

Os valores de eficácia para cada uma das concentrações e tempo de cultura do extrato *A. fastigiatum* foram calculados a partir dos valores de toxicidade como se indica na Tabela 11:

Tabela 11-Valores de eficácia do extrato aquoso *A. fastigiatum* em cada uma das concentrações e tempos de incubação sobre células Jurkat.

% Eficácia <i>Ageratum fastigiatum</i>			
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	24h	48h	72h
12,5	10,71	10,85	23,75
25	35,73	31,74	31,50
50	89,08	97,88	99,50

Os resultados reportados na Tabela 11 mostram que a eficácia do extrato *A. fastigiatum* aumentou à medida que foi aumentando a concentração. Sendo o extrato mais eficaz na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ após de 72h de cultura onde se obteve um valor de 99,50%.

5.6 Efeito do tratamento com os extratos PBf, Mfet, Mfaq e Afpa sobre o ciclo celular em Células Jurkat

Para a realização desse ensaio, foi escolhida a concentração com melhor atividade citotóxica (PBf: 200 $\mu\text{g/mL}$; Mfet e Mfaq: 125 $\mu\text{g/mL}$; Afpa: 50 $\mu\text{g/mL}$) para cada extrato após 24horas de tratamento. A análise das diferentes fases do ciclo celular de células Jurkat foi feita por citometria de fluxo, seguindo a metodologia “rápida” descrita por Riccardi et al. (2006).

Os resultados foram expressos como média do percentual de eventos, a comparação entre os tratamentos foi realizada utilizando-se ANOVA *two-way*, com *post test* Bonferroni. Os dados obtidos estão apresentados nas Figuras 22, 23, 24 e 25.

5.6.1 Extrato etanólico *Pseudobrickellia brasiliensis* (folhas)

Os resultados representados na Figura 22 indicaram aumento do conteúdo de DNA degradado na fase Sub G0-G1 nas culturas tratadas com extrato PBf a 200µg/mL ($25,55 \pm 6,18\%$) e PCX ($31,70 \pm 1,92\%$) quando comparado com as culturas CONT ($14,68 \pm 1,89\%$). Houve ainda uma diminuição de células Jurkat na fase G2M nas culturas tratadas com PBf a 200µg/mL ($10,26 \pm 2,08\%$) e PCX ($4,51 \pm 1,81\%$) quando comparadas com as culturas CONT ($18,30 \pm 3,28\%$).

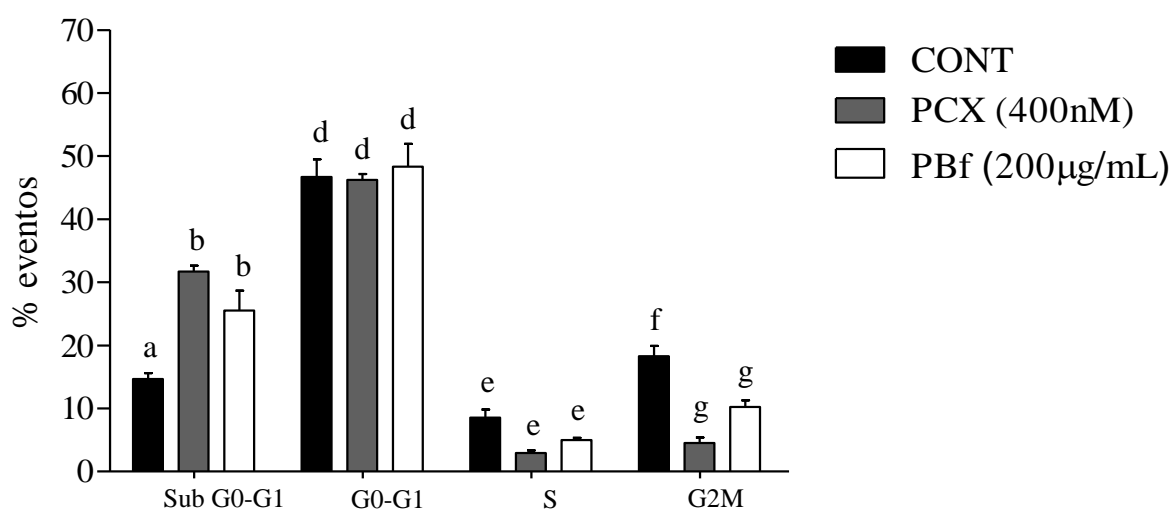


Figura 22- Percentual de eventos para cada fase do ciclo celular de Jurkat tratadas com extrato etanólico de *P. brasiliensis* (200µg/mL) após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças estatísticas são identificadas pelas letras “a”, “b”, “d”, “e”, “f” e “g”, para as comparações nas subfases Sub G0-G1, G0-G1, S e G2M entre as culturas Controle (CONT), Paclitaxel (PCX) e *P. brasiliensis* (200 µg/mL) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA com *post hoc* Bonferroni.

5.6.2 Extrato etanólico *Miconia ferruginata* (caule)

Os resultados do efeito do extrato Mfet a 125µ/mL sobre o ciclo celular de células Jurkat, após 24h de tratamento está representado na Figura 23. De acordo com os resultados obtidos, houve um maior número de células na fase Sub G0-G1 após tratamento com PCX ($31,70 \pm 1,92\%$), culturas tratadas com extrato Mfet ($49,68 \pm 19,86\%$) quando comparadas as células controle (CONT = $14,68 \pm 1,89\%$). Na fase G0-G1, encontrou-se menor acumulação de eventos nas culturas tratadas com extrato Mfet ($33,53 \pm 14,26\%$) em comparação as culturas CONT ($46,70 \pm 5,54\%$) e PCX ($46,25 \pm 1,84\%$). O percentual de células Jurkat tratadas com o extrato Mfet ($3,71 \pm 2,73\%$) e

PCX($4,51 \pm 1,81\%$), e presentes na fase G2M de multiplicação celular foi menor do que as células Jurkat sem tratamento (CONT: $18,30 \pm 3,28\%$).

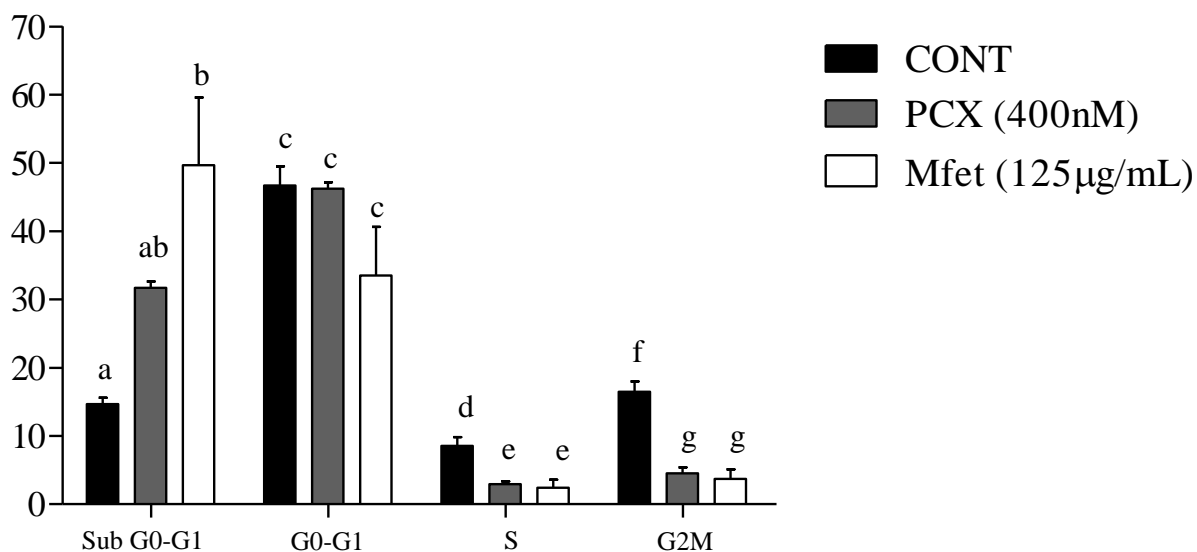


Figura 23- Percentual de eventos para cada fase do ciclo celular de Jurkat tratadas com extrato etanólico de *M. ferruginata* (125µg/mL) após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças estatísticas são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f” e “g”, para as comparações nas subfases Sub G0-G1, G0-G1, S e G2M entre as culturas Controle (CONT), Paclitaxel (PCX) e *M. ferruginata* (125µg/mL) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA com *post hoc* Bonferroni.

5.6.3 Extrato aquoso *Miconia ferruginata* (caule)

Os resultados representados na Figura 24 indicaram que houve um aumento do conteúdo de DNA degradado na fase Sub G0-G1, nas culturas tratadas com PCX ($31,70 \pm 1,92\%$), quando comparado com as culturas CONT ($14,68 \pm 1,89\%$) e às culturas celulares incubadas com extrato Mfaq a 125µg/mL ($20,70 \pm 5,47\%$). Foi observado uma menor porcentagem de células em fase G2M nas culturas tratadas com Mfaq a 125µg/mL ($8,19 \pm 2,82\%$) e PCX ($4,51 \pm 1,81\%$) quando comparadas com as culturas CONT($18,30 \pm 3,28\%$).

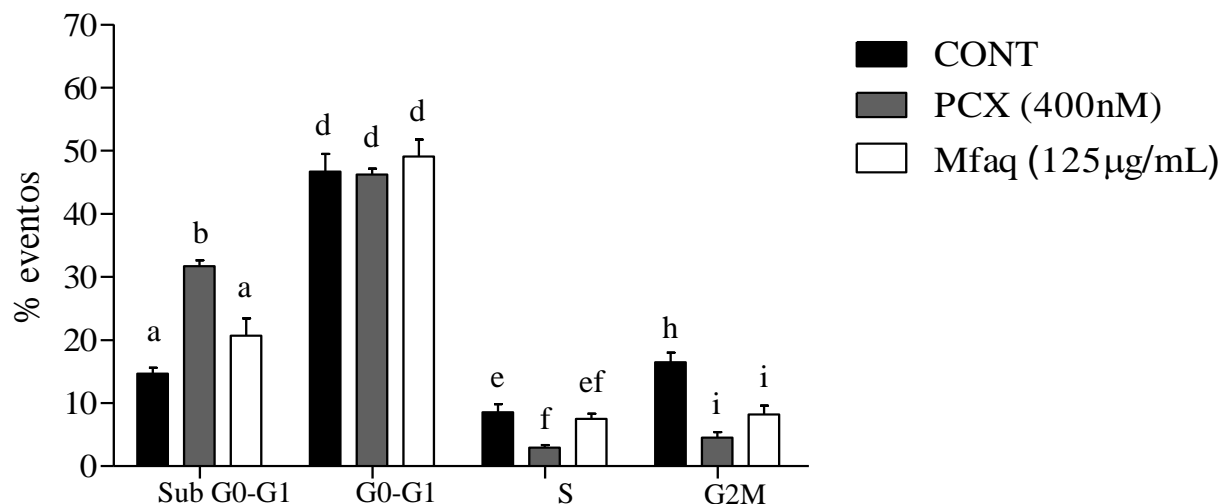


Figura 24- Percentual de eventos para cada fase do ciclo celular de Jurkat tratadas com extrato aquoso de *M. ferruginata* (125µg/mL) após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças estatísticas são identificadas pelas letras “a”, “b”, “d”, “e”, “f”, “h” e “i”, para as comparações nas subfases Sub G0-G1, G0-G1, S e G2M entre as culturas Controle (CONT), Paclitaxel (PCX) e *M. ferruginata* (125µg/mL) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA com *post hoc* Bonferroni.

5.6.4 Extrato etanólico *Ageratum fastigiatum* (partes aéreas)

A figura 25 ilustra o efeito produzido do extrato *A. fastigiatum* sobre o ciclo celular das células Jurkat após incubação com o extrato de *A. fastigiatum* (Afpa) e o fármaco PCX. Os resultados mostraram que a porcentagem de células presentes na fase Sub G0-G1 foi maior nas culturas tratadas com PCX ($31,70 \pm 1,92\%$) quando comparadas com o grupo CONT ($14,68 \pm 1,89\%$) e às culturas incubadas com extrato Afpa a 125µg/mL ($20,70 \pm 1,56\%$). O tratamento com Afpa a 125µg/mL ($57,58 \pm 2,46\%$) promoveu um aumento no percentual de células na fase G0-G1, quando comparado às culturas CONT ($46,70 \pm 5,54\%$) e PCX ($46,25 \pm 1,84\%$). O tratamento com Afpa a 125µg/mL ($7,04 \pm 0,95\%$) e com PCX ($4,51 \pm 1,81\%$) diminuiu o número de células na fase G2M quando comparado às culturas não tratadas (CONT: $18,30 \pm 3,28\%$).

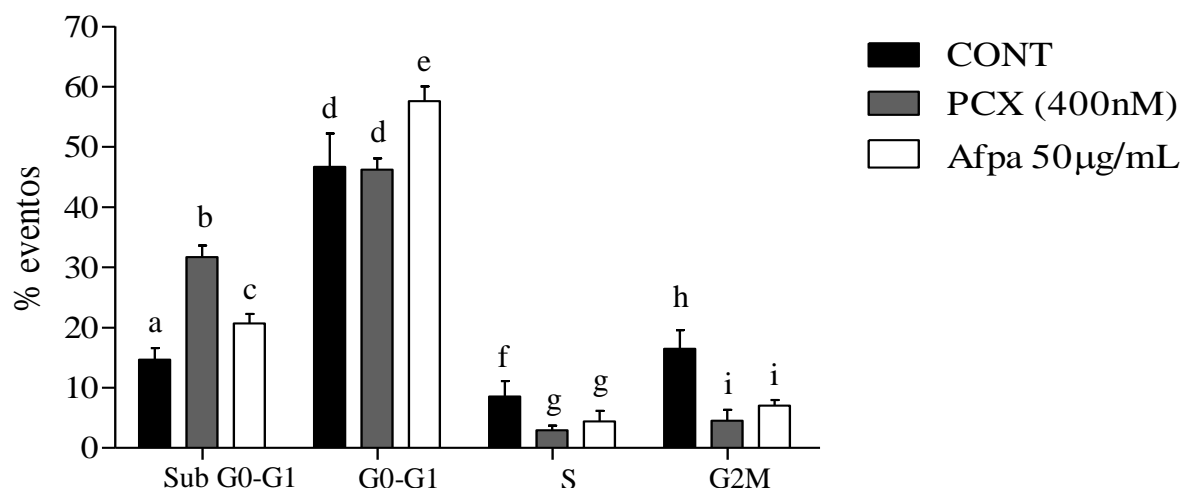


Figura 25- Percentual de eventos para cada fase do ciclo celular de Jurkat tratadas com extrato etanólico de *A. fastigiatum* (50µg/mL) após 24h de tratamento (n=4). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças estatísticas são identificadas pelas letras “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f”, “g”, “h” e “i”, para as comparações nas subfases Sub G0-G1, G0-G1, S e G2M entre as culturas Controle (CONT), Paclitaxel (PCX) e *A. fastigiatum* (50µg/mL) respectivamente ($p \leq 0,05$). Método estatístico utilizado ANOVA com *post hoc* Bonferroni.

5.7 Análise da atividade apoptótica e necrótica dos extratos sobre células Jurkat por citometria de fluxo utilizando os marcadores Anexina-V e PI

Com o propósito de determinar se a atividade citotóxica encontrada nos extratos sobre células tumorais Jurkat após 24h de tratamento estava associada à mecanismos apoptóticos ou necróticos, as culturas celulares foram marcadas simultaneamente com Iodeto de Propídeo e Anexina V-FITC e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados apresentados a seguir foram obtidos conforme o padrão de marcação das populações celulares, sendo: Anexina V⁻/PI⁻ (células viáveis), Anexina V⁺/PI⁻ (Apoptose recente), Anexina V⁺/PI⁺ (Apoptose tardia) e Anexina V⁻/PI⁺ (necrose). Os dados obtidos foram expressos como média \pm DP.

Os resultados para os extratos PBf (200µg/mL), Mfet e Mfaq (125µg/mL) e Afpa (50µg/mL) estão representados nas Figuras 26, 27, 28 e 29 e nas Tabelas 12, 13, 14 e 15 respectivamente.

5.7.1 Extrato etanólico *Pseudobrickellia brasiliensis* (folhas)

Os resultados apresentados na Tabela 12 e Figura 26 mostraram que o percentual de células em apoptose recente induzido pelo extrato PBf aumentou em comparação aos percentuais nas culturas CONT e culturas tratadas com PCX. Por outro lado observou-se que a porcentagem de células em apoptose tardia foi menor nas culturas tratadas com extrato em comparação às culturas com PCX, no entanto o principal mecanismo de morte celular do extrato foi apoptose, obtendo-se um total de 51,53% de células apoptóticas. A Figura 25 apresenta uma ilustração representativa das células nas diferentes condições.

Tabela 12- Percentuais de células Jurkat viáveis, em necrose, em apoptose recente e tardia, em culturas tratadas com extrato *P. brasiliensis*.

População celular	CON	PCX(400nM)	PBf(200µg/mL)
% Células viáveis	a	b	c
	79,58 ± 6,602	5,770 ± 1,971	42,15 ± 10,78
% Apoptose recente	a	a	b
	1,225 ± 1,079	7,305 ± 1,877	25,65 ± 7,450
% Apoptose tardia	a	b	a
	12,46 ± 10,61	84,53 ± 4,099	25,88 ± 4,296
% Necrose	a	a	a
	6,738 ± 5,479	2,403 ± 1,417	9,225 ± 3,358

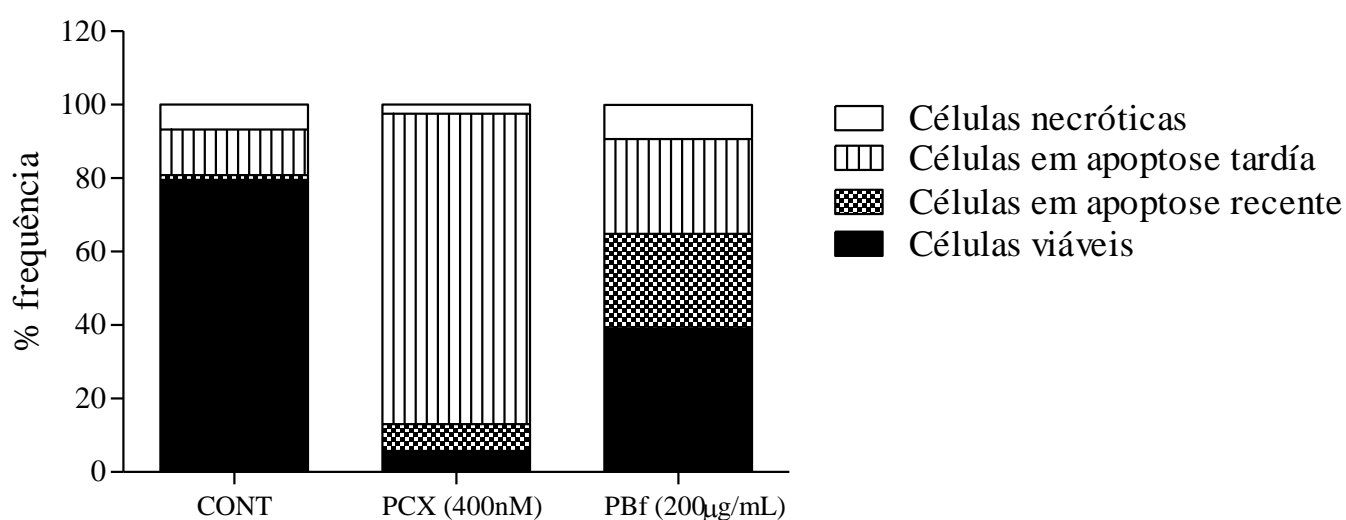


Figura 26- Percentual de células Jurkat: viáveis ■, em necrose □, em apoptose recente ■ e tardia ■ em culturas Controle (CONT), tratadas com Paclitaxel (PCX) e extrato *P. brasiliensis* (200µg/mL) após 24h de cultura. (n=4). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferença significativa considerada quando $p \leq 0,05$; ANOVA com post hoc de Tukey.

5.7.2 Extrato etanólico *Miconia ferruginata* (caule)

Os resultados ilustrados na Tabela 13 e Figura 27 demonstram que o percentual de células em apoptose tardia induzido pelo extrato Mfet aumentou em comparação as culturas CONT, no entanto com relação às culturas tratadas com PCX os valores foram semelhantes. Portanto, o mecanismo principal de morte celular do extrato sobre células Jurkat foi apoptose, obtendo-se um total de 84,15% de células apoptóticas. A Figura 27 apresenta uma ilustração sobre as células nas diferentes condições.

Tabela 13- Percentuais de células Jurkat viáveis, em necrose, em apoptose recente e tardia, em culturas tratadas com extrato *M. ferruginata* etanólico.

População celular	CONT	PCX(400nM)	Mfet(125µg/mL)
Células viáveis	a 79,58 ± 6,602	b 5,770 ± 1,971	b 3,543 ± 4,258
Apoptose recente	a 1,225 ± 1,079	b 7,305 ± 1,877	b 5,025 ± 0,8276
Apoptose tardia	a 12,46 ± 10,61	b 84,53 ± 4,099	b 79,13 ± 4,200
Necrose	a 6,738 ± 5,479	a 2,403 ± 1,417	a 12,34 ± 7,631

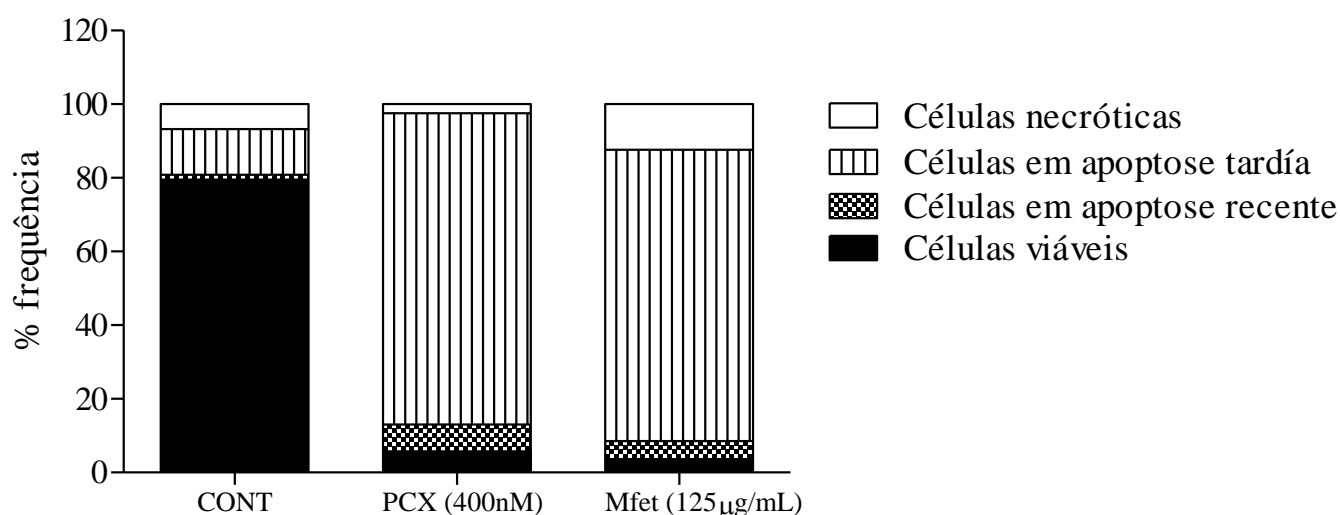


Figura 27- Percentual de células Jurkat: viáveis ■, em necrose □, em apoptose recente ■ e tardia ■ em culturas Controle (CONT), tratadas com Paclitaxel (PCX) e extrato etanólico de *M. ferruginata* (125µg/mL) após 24h de cultura. (n=4). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferença significativa considerada quando $p \leq 0,05$; ANOVA com post hoc de Tukey.

5.7.3 Extrato aquoso *Miconia ferruginata* (caule)

Os resultados da Tabela 14 e Figura 28 indicam que o percentual de células em apoptose tardia induzido pelo extrato Mfaq aumentou em comparação as culturas CONT e as culturas tratadas com PCX. Sendo o mecanismo principal de morte celular do extrato sobre células Jurkat foi apoptose, obtendo-se um total de 94,83% de células apoptóticas. A Figura 28 apresenta uma ilustração sobre as células nas diferentes condições.

Tabela 14- Percentuais de células Jurkat viáveis, em necrose, em apoptose recente e tardia, em culturas tratadas com extrato *M. ferruginata* aquoso.

População celular	CONT	PCX	Mfaq(125µg/mL)
Células viáveis	a	b	b
	79,58 ± 6,602	5,770 ± 1,971	3,245 ± 2,476
Apoptose recente	a	b	b
	1,225 ± 1,079	7,305 ± 1,877	4,258 ± 1,362
Apoptose tardia	a	b	b
	12,46 ± 10,61	84,53 ± 4,099	90,58 ± 3,840
Necrose	a	a	a
	6,738 ± 5,479	2,403 ± 1,417	1,94 ± 0,2588

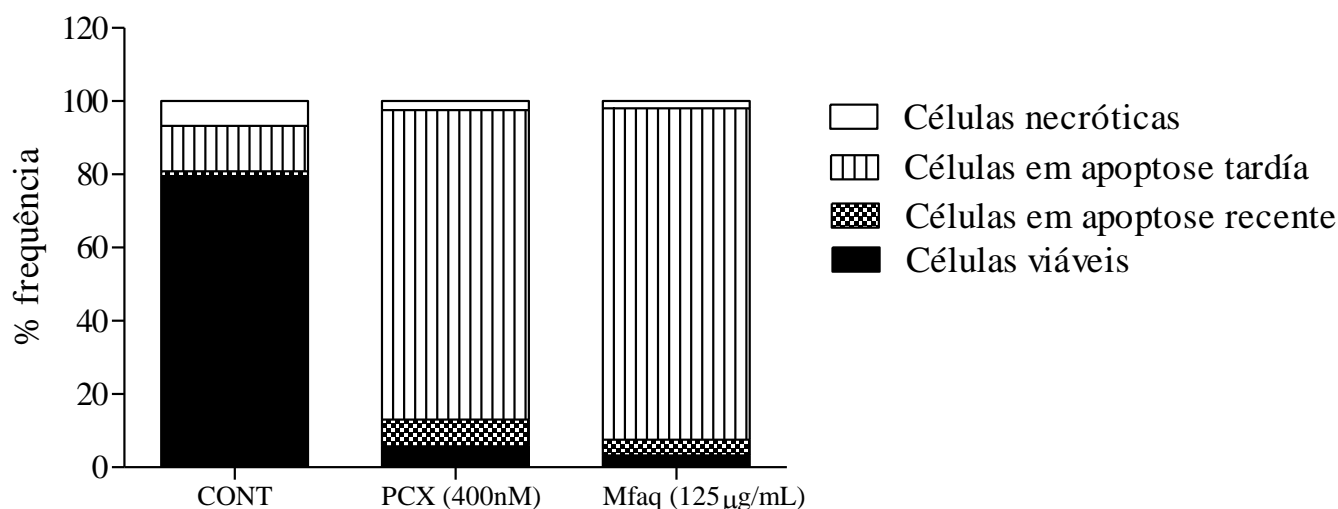


Figura 28-Percentual de células Jurkat: viáveis ■, em necrose □, em apoptose recente ■ e tardia ■ em culturas Controle (CONT), tratadas com Paclitaxel (PCX) e extrato aquoso de *M. ferruginata* (125µg/mL) após 24h de cultura. (n=4). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferença significativa considerada quando $p \leq 0,05$; ANOVA com post hoc de Tukey.

5.7.4 Extrato etanólico *Ageratum fastigiatum* (partes aéreas)

Os resultados da tabela 15 e figura 29 mostram que o percentual de células em apoptose recente induzido pelo extrato Afpa aumentou em comparação as culturas CONT e as culturas tratadas com PCX. Também se observou um incremento no percentual de células em apoptose tardia nas culturas tratadas com extrato quando comparado com as culturas CONT. Portanto, o mecanismo principal de morte celular do extrato sobre células Jurkat foi apoptose, obtendo-se um total de 87,08% de células apoptóticas. A Figura 29 ilustra às células nas diferentes condições.

Tabela 15- Percentuais de células Jurkat viáveis, em necrose, em apoptose recente e tardia, em culturas tratadas com extrato *A. fastigiatum*.

População celular	CONT	PCX	Afpa(50µg/mL)
Células viáveis	a 79,58 ± 6,602	b 5,770 ± 1,971	b 8,675 ± 2,197
Apoptose recente	a 1,225 ± 1,079	b 7,305 ± 1,877	c 24,45 ± 3,304
Apoptose tardia	a 12,46 ± 10,61	b 84,53 ± 4,099	c 62,63 ± 3,003
Necrose	a 6,738 ± 5,479	a 2,403 ± 1,417	a 4,198 ± 1,949

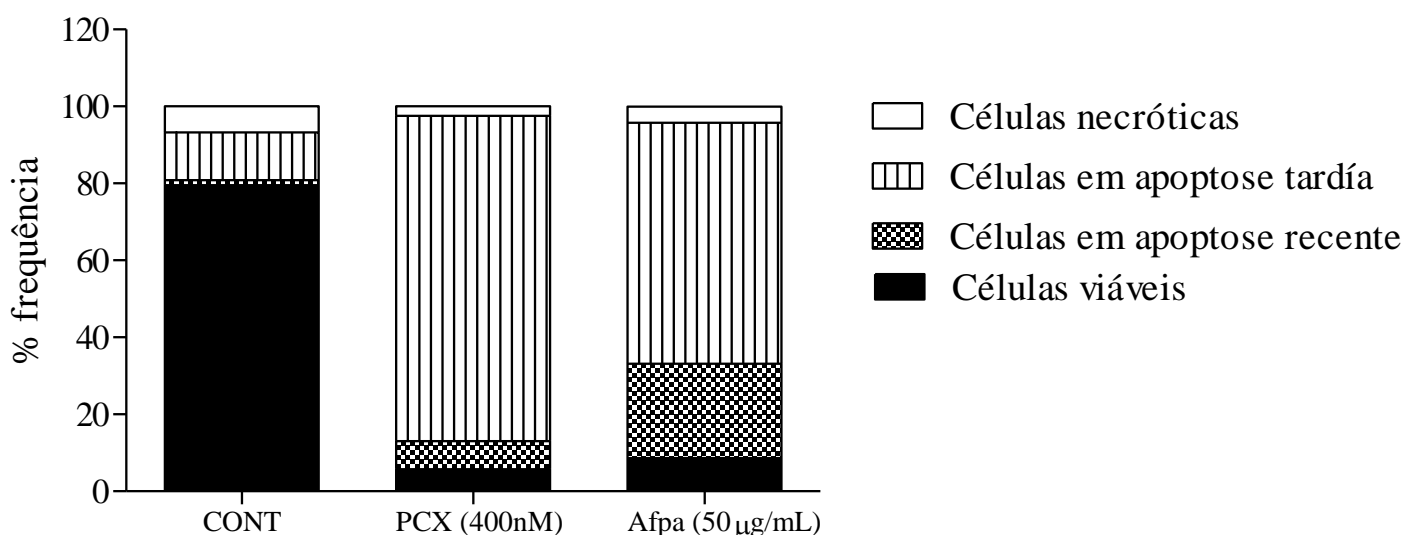


Figura 29- Percentual de células Jurkat: viáveis ■, em necrose □, em apoptose recente ▤ e tardia ▨ em culturas Controle (CONT), tratadas com Paclitaxel (PCX) e extrato aquoso de *A. fastigiatum* (50µg/mL) após 24h de cultura. (n=4). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferença significativa considerada quando $p \leq 0,05$; ANOVA com *post hoc* de Tukey.

6 DISCUSSÃO

A utilização de produtos naturais como potenciais agentes antitumorais tem uma longa história iniciada com a medicina popular, a qual foi incorporada através dos anos à medicina alopática. Várias drogas usadas atualmente nos tratamentos quimioterápicos foram isoladas a partir de plantas ou derivadas de um protótipo natural. (COSTA-LOTUFO et al, 2005). Segundo Cragg e Newman (2000), cerca de 50% dos medicamentos utilizados clinicamente como antitumorais foram obtidos de fontes naturais ou fontes relacionadas a elas. Portanto, o uso de produtos naturais tem sido a estratégia com maior sucesso na descoberta de novos fármacos na terapia antineoplásica. (BEZERRA et al., 2008).

Extratos das plantas *P. brasiliensis*, *M. ferruginata* e *A. fastigiatum*, espécies endêmicas do Cerrado, vem sendo usados pela medicina popular para fins terapêuticos, no entanto, de acordo com levantamento bibliográfico feito recentemente, ainda não existem estudos científicos relacionados à atividade antitumoral. Diante disso, neste trabalho buscou-se avaliar se os extratos vegetais dessas plantas apresentariam toxicidade sobre a linhagem tumoral Jurkat, em concentrações conhecidamente não tóxicas para as células humanas PBMC. A eficácia desses extratos também foi comparada àquela observada no tratamento, *in vitro*, com o fármaco padrão Paclitaxel. Em seguida aprofundamos os estudos para entender os mecanismos de morte envolvidos nessa ação antitumoral seletiva apresentada pelos extratos estudados.

O DMSO tem sido utilizado desde 1959 como agente protetor nos processos de congelamento e descongelamento de células. Uma das diferenças de outros compostos para o DMSO está na capacidade deste de solubilizar distintos tipos de substâncias e transpor barreiras hidrofóbicas, como a membrana plasmática.

Ditas propriedades fazem que o DMSO seja escolhido para ser usado como solvente útil na solubilização de drogas de aplicações terapêuticas e na incorporação de componentes pouco solúveis em meios aquosos para ensaios biológicos *in vitro* (SANTOS et al, 2003; ABBRUZZESE et al., 2013). No entanto em um estudo verificou-se que o DMSO exibiu um efeito citotóxico sobre células HeLa em concentrações superiores a 2% e um efeito inibidor no crescimento celular a

concentrações inferiores a 1% (FORMAN et al., 1999) razão pela qual o primeiro ensaio realizado consistiu em investigar a concentração de DMSO (Veículo utilizado para diluição dos extratos) que não alteraria a integridade das Jurkat, já que a perda de viabilidade de células por contato com DMSO poderia comprometer a análise da provável atividade citotóxica dos extratos. Nos ensaios, foi avaliada a toxicidade do DMSO em diferentes concentrações e tempos de incubação, através do ensaio de viabilidade celular por exclusão com Azul de tripan, método já padronizado no grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia da UFVJM.

Os resultados demonstraram que o DMSO, em concentrações iguais ou inferiores aos 2% v/v após 24h ou 48h de tratamento não diminuíram a viabilidade das Jurkat, no entanto após 72h a viabilidade das Jurkat diminuiu em comparação as culturas CONT. Portanto a concentração final de DMSO utilizada para todos os ensaios foi de 1% v/v, concentração que não afetou o percentual de células viáveis com relação às culturas CONT durante todos os tempos de incubação.

Uma vez determinada a concentração permitida do DMSO nas culturas, foi realizada uma triagem para avaliar a citotoxicidade dos quatro extratos sobre células Jurkat. O extrato etanólico das folhas de *P. brasiliensis*, apresentou toxicidade sobre as Jurkat apenas na concentração de 200µg/mL durante todos os tempos de incubação, embora após 24 horas de tratamento o extrato demonstrou maior seletividade citotóxica (IS: 5,94) sobre células tumorais que em PBMC. Nessa mesma concentração o extrato também apresentou maior eficácia com relação ao fármaco padrão Paclitaxel obtendo-se um valor de 54,07%.

Estudos prévios com *P. brasiliensis* reportam a presença de terpenos e sesquiterpenos como constituintes químicos, entre eles: hidroxigermacreno, lupeol e seu isômero, acetato de β -amirina, espatulenol, cadineno, cadinol, oplopanona e acetato de α -acetoxi- β -amirina (BOHLMANN et al, 1984). ALMEIDA (2015) avaliou extratos etanólicos de caules, flores e folhas da *P. brasiliensis* por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), sugerindo a presença de flavonóides, das classes: flavonas e flavonóis principalmente. No mesmo estudo, foram analisados os óleos essenciais das flores e folhas da planta por cromatografia gasosa acoplada a Massas (GC-EM), onde foram identificados 22 compostos no óleo

das flores e 27 no óleo procedentes das folhas encontrando-se como componentes maioritários: o β -pineno, limoneno, α -pineno, sabineno, óxido de cariofileno e E-cariofileno.

O lupeol um dos triterpenos presentes na *P.brasiliensis* é um composto achado com bastante frequência em diferentes famílias de plantas (CONNOLLY; HILL, 2008). Há relatos na literatura de que esse componente possui propriedades anticancerígenas sobre distintas linhagens tumorais (GALLO; SARACHINE, 2009). Em um desses estudos, a planta *Sacarracenia*, na qual foi isolado o lupeol, foi demonstrando uma alta citotoxicidade dessa substância sobre células de leucemia linfocítica P-388 (MILES et al, 1974, 1976). Mais tarde, em bioensaio feitos do extrato etanólico das folhas de *Dendropanax querceti*, foi verificado que o lupeol atuou como responsável da atividade citotóxica observada sobre células de carcinoma hepatocelular humano Hep-G2, assim como também em células cancerígenas epidermóides humanas A-431 e em células H-4IIE de hepatocarcinoma de rato (MORIARTY et al, 1998).

Estudos ainda demonstraram que o β -pineno, α -pineno e D-limoneno, três dos compostos majoritários do óleo essencial (flores e folhas) da planta *P.brasiliensis* além de produzir um efeito citotóxico sobre certo de tipo de linhagens tumorais, promovem uma ação sinérgica antitumoral com drogas anticancerígenas (ZHANG et al, 2015).

Estudos realizados por Jin e colaboradores (2010) demonstraram que células das linhagens A549 e Hep-G2 sofreram morte celular por estresse oxidativo provocado pela ação do composto α -pineno (KYONG-SUK et al, 2010), outro composto observado em *P. brasiliensis*. Seu isômero, o β -pineno, também demonstrou um efeito anti-proliferativo em células tumorais A375, em estudos em que foi isolado da planta *Schefflera heptaphylla* (BAYALA et al, 2014). Em uma pesquisa de sinergia encontrou-se que o β -pineno, junto com o α -pineno, potencializaram a eficácia do Paclitaxel, promovendo o processo de apoptose sobre células A549 (ZHANG et al., 2015). Zhang e colaboradores demonstraram que o D-limoneno apresentou um efeito antitumoral sinérgico quando utilizado com o berberine sobre células MGC803 (câncer gástrico). Esse efeito foi caracterizado por mudanças nas fases do ciclo celular, e pela produção de espécies reativas de oxigênio que induziram as células à apoptose por via intrínseca mediado por mitocôndrias (ZHANG et al., 2014).

Estudos mais aprofundados sobre o lupeol e o D-limoneno revelaram que além de possuir propriedades citotóxicas sobre células tumorais, esses compostos são capazes de interferir nas fases do ciclo celular assim como de induzir apoptose celular por diferentes vias de sinalização (SALMINENA et al., 2008). Lee *et al.* (2007), trataram células de Carcinoma Espinocelular da Cavidade Bucal humanas (Tu159, MDA1986 e CAL27) com lupeol e observaram que o composto não só diminuiu o crescimento celular, como também inibiu a atividade de NF- κ B e ativou mecanismos de apoptose mediados por TRAIL (LEE et al, 2007; MURTAZA, 2009). De forma semelhante, a exposição de lupeol sobre células PC-3 produziu efeito no ciclo celular, causando acumulação de células na fase G2M, pela expressão de ciclina B, cdc25C, cdc2, Plk1, 14-3-3s, GADD45, e do gene p21^{WAF1 / CIP1}, que regula a progressão das células ao longo da fase G2 (PRASAD et al, 2008). Nesse mesmo estudo, foi observado que o lupeol induziu células PC-3 à apoptose pela via PI3K/AKT associada à expressão da proteína Bax, caspase-3, e -9, e expressão gênica de APAF1. Também foi demonstrada uma regulação negativa dos genes antiapoptóticos Bcl-2, via essa também induzida pelo D-limoneno sobre células K562 e HL60 (JI et al, 2006), e LS174 (JIA et al, 2012). Esses estudos estão em concordância com os nossos dados apresentados sobre a avaliação do ciclo celular, e os mecanismos de morte envolvidos na ação citotóxica do extrato de *P. brasiliensis* sobre células Jurkat uma vez que, além de induzir a apoptose em 54,50% das células tratadas, foi verificada uma acumulação de células em fase G0-G1, bem como uma diminuição de células na fase G2M em comparação com as células não tratadas (CONT). Serão necessárias pesquisas para avaliar qual via de sinalização pró-apoptótica poderia estar relacionada a esse efeito observado.

Vale ressaltar que no presente estudo não foi realizado isolamento ou identificação dos compostos bioativos presentes nos extratos produzidos da planta *P. brasiliensis*, por isto não é possível afirmar que a citotoxicidade apresentada pelo extrato sobre a linhagem tumoral Jurkat tenha sido provocada por algum composto específico. No entanto, baseados em estudos fitoquímicos prévios, tanto do nosso grupo de pesquisa quanto de outros grupos, que relataram a presença e a atividade biológica do lupeol, o β -pineno e o α -pineno, torna-se relevante mencionar a perspectiva de se realizar novas frentes de investigação que visem avaliar a potencial citotóxico desses compostos, isoladamente, sobre as células Jurkat e verificar se os resultados

apresentados em nosso estudo é fruto, pelo menos em parte, à ação dessas substâncias com atividade biológica já comprovada.

Em nosso estudo também foram avaliados os extratos etanólico e aquoso da *M. ferruginata* provenientes dos caules da planta. Na avaliação da atividade citotóxica dos extratos sobre células Jurkat, encontramos que os dois extratos apresentaram uma resposta concentração-dependente em todos os tempos de incubação (24h, 48h ou 72h), sendo mais seletivos após 24 horas de tratamento (IS: Mfet: 3,39; Mfaq:4,27). Nesse mesmo tempo de incubação, os extratos se mostraram mais eficazes na concentração de 125ug/mL quando comparado o fármaco padrão Paclitaxel, obtendo-se valores de eficácia de 102% para o extrato etanólico e 105% para o extrato aquoso.

Em um estudo fitoquímico realizado com extratos etanólicos e aquosos das folhas, flores e caules de *M. ferruginata* foi identificada a presença de quatorze compostos correspondentes a diferentes classes de sesquiterpenos, hidrocarbonetos, monoterpenos, fenil propanóides e álcoois, sendo os compostos majoritários os sesquiterpenos β -cariofileno e α -humuleno. Esses compostos estão associados à atividades biológicas como anti-inflamatórios, antifúngicos e antitumorais (RIBEIRO, 2015). Segundo relatos prévios, o β -cariofileno e seu isômero α -humuleno possuem propriedades citotóxicas sobre alguns tipos de linhagens tumorais. De acordo com Hadri e colaboradores (2010), o α -humuleno isolado da planta *Salvia officinalis*, produziu uma forte citotoxicidade sobre células de adenocarcinoma retal e células de melanoma de mama (HADRI et al, 2010). Esse estudo corrobora com outra pesquisa, utilizando-se a mesma planta, onde foi demonstrado um efeito tóxico causado pelo α -humuleno sobre células de carcinoma de próstata LNCap (LOIZZO et al, 2007). Na planta *Abies balsamea* também foi identificada a presença de β -cariofileno, sendo demonstrada a atividade citotóxica de seu isômero α -humuleno, por meio de mecanismos de morte celular mediados por espécies reativas de oxigênio em células MCF-7 (mama) (LEGAULT, 2003), no mesmo estudo também relataram a ação citotóxica do α -humuleno, mediada por espécies reativas de oxigênio, sobre células tumorais PC-3 (próstata), A-549 (Adenocarcinoma de pulmão), DLD-1(cólon) e células M4Beu (melanoma) (LEGAUT et al., 2003).

Ainda não foram estudados os efeitos do tratamento com esses compostos sobre o ciclo celular de linhagens tumorais, no entanto, com relação às vias apoptóticas, tem sido demonstrado que o β -cariofileno é capaz de induzir a apoptose mediante a supressão das vias PI3K / AKT / mTOR / S6K1 e ROS mediada pela ativação dos MAPKs (PARK, 2011). Amiel e colaboradores (2012) demonstraram que células BS-24-1 (células T de linfoma de ratos) tratadas com β -cariofileno foram induzidas a apoptose pela ativação de caspase-3, promovendo à fragmentação internucleossômica de DNA, principal característica da apoptose (AMIEL et al, 2012). Resultados semelhantes foram obtidos por Dahham e colaboradores (2016) utilizando células HCT-116 (carcinoma de cólon) tratadas com β -cariofileno derivado do óleo essencial da planta *Aquilaria crassna*. Esses estudos estão em conformidade com os resultados apresentados em nosso estudo (DAHAM et al, 2016). A atividade citotóxica encontrada, e o mecanismo de morte celular em células Jurkat tratadas com extratos da *M. ferruginata* é basicamente por apoptose, onde foi verificado um percentual de células em apoptose de 79,13% e 90,58% nos tratamentos com os extrato etanólico e aquoso, respectivamente. Adicionalmente, na análise de ciclo celular foi possível evidenciar mudanças nas fases G0-G1 e G2M das células tratadas com esses extratos, mostrando uma permanência das células em fase G0-G1 e uma acumulação de células na fase G2M que pode estar relacionada com processos inibitórios de progressão celular nas fases finais de divisão das células Jurkat. De maneira semelhante ao mencionado para o extrato de *P. brasiliensis*, apesar de não ter sido foco do presente estudo o isolamento químico de compostos do extrato, estudos futuros realizados com compostos isolados poderão esclarecer quais moléculas poderiam estar envolvidas nos dados obtidos na ação citotóxica seletiva observada nos extratos de *M. ferruginata*.

Outro extrato avaliado foi o extrato etanólico das partes aéreas de *Ageratum fastigiatum*, o qual também apresentou uma resposta citotóxica contra células Jurkat, de maneira concentração-dependente, em todos os tempos de cultura (24h, 48h, ou 72h) avaliados. De acordo com os resultados o extrato mostrou uma alta seletividade (IS: 21,78) após 24h de tratamento em comparação as células PBMC. Os valores de eficácia calculados em relação ao fármaco padrão Paclitaxel foram de 104,51%, 92,5% e 99,5%, para as culturas que receberam tratamento de 24h, 48h e 72h respectivamente.

Em uma pesquisa fitoquímica de plantas coletadas no estado de Goiás, Bohlmann e colaboradores (1981 e 1983) avaliaram a composição química da espécie *A. fastigiatum*, encontrando, nas partes aéreas da planta, estruturas químicas como: cromenos, flavonóides, esqualeno, acetato de taraxasterol, o triterpenoide lupeol, glutinol, sesquiterpenoides derivados de eudesmano, derivado do epímero labdane além de diterpenoides do tipo caurano. (BOLHMANN, 1981-1983). Em trabalho subsequente foi realizada uma triagem fitoquímica de partes aéreas do óleo essencial da *A. fastigiatum* coletada no município de São João Del Rei – MG. Del-Vechio-Vieira e colaboradores (2009a e 2009b), onde 90% dos compostos encontrados correspondiam a monoterpenos e sesquiterpenos como: germacreno-D, β -cariofileno e 1,10-di-epicubenol (DEL-VECHIO-VIEIRA et al., 2009a; 2009b). Estudos mais recentes feitos no município de Diamantina-MG, demonstraram que o óleo essencial de partes aéreas da referida planta apresentou 26 compostos, dentre eles 11 monoterpenos e 15 sesquiterpenos, sendo os compostos majoritários o α -pineno, limoneno, trans-cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno, 1,2-epóxido humuleno, 1,6-humuladien-3-ol e α -cadinol (AVELAR-FREITAS et al., 2013b).

Dentro dos constituintes químicos da *A. fastigiatum*, o germacreno-D, o trans-cariofileno e o α -humuleno tem sido caracterizados por apresentar atividade antitumoral, como descrito no estudo de Costa e colaboradores (2015). Nesse estudo, tais compostos isolados do óleo essencial de *Zornia brasiliensis*, apresentaram capacidade inibitória sobre a proliferação de células de melanoma de rato B16-F10 (COSTA et al, 2015). O 1,10-di-*epi*-cubenol, isolado da planta *Ferulago macrocarpa*, e também presente no óleo essencial das partes aérea da *A. fastigiatum*, demonstrou produzir um efeito anti-proliferativo sobre células da linhagem e HT-29 (adenocarcinoma de cólon) e MCF-7 (mama) (SAJJADI, 2015).

Alguns dos compostos majoritários da *A. fastigiatum* como α -pineno, limoneno, α -humuleno estão presentes também nas plantas *P.brasiliensis* e *M. ferruginata* como mencionado anteriormente, sendo esta planta a espécie com maior número de componentes com atividade antitumoral, o qual poderia estar relacionado com a alta seletividade, eficácia de *A. fastigiatum* sobre células Jurkat, demonstradas em nosso estudo. Quanto ao efeito do extrato dessa planta sobre as fases do ciclo celular e os mecanismos de morte envolvidos, nossos resultados demonstram um comportamento

similar aos outros extratos estudados, evidenciando-se uma retenção de eventos na fase G2M, impedindo assim o processo de divisão celular, bem como a evidência de mecanismos apoptóticos predominantes, uma vez que o percentual de células em apoptose recente foi de 24,45%, e em apoptose tardia 62,63%. Apesar de não ter comprovado neste estudo que a alta toxicidade da *A. fastigiatum* sobre Jurkat foi provocada pela presença específica de determinados compostos, seria razoável pensar que a presença de compostos com atividade antitumoral já descrita na literatura, poderia estar contribuindo, pelo menos em partes, com os resultados aqui apresentados.

O extrato de *Ageratum fastigiatum*, na comparação com os demais extratos avaliados em nosso estudo, foi o que apresentou melhores resultados na triagem de avaliação citotóxica sobre células Jurkat, mostrando maior seletividade e eficácia, o que o coloca como um alvo promissor na busca de tratamentos alternativos e promissores de combate a tumores.

Como se observou todos os extratos estudados nesta pesquisa induziram a atividade citotóxica ou citostática sobre células tumorais Jurkat. A primeira propriedade pôde ser evidenciada pela diminuição na contagem celular com relação ao número de células presentes ao início dos ensaios e a atividade citostática foi observada durante o processo de proliferação celular onde se evidenciou uma diminuição do número de células em uma ou várias subfases do ciclo celular, considerando-se que os extratos produziram um bloqueio da progressão das fases do ciclo normal das células. A retenção do ciclo celular é um evento favorável na indução de apoptose em células tumorais, devido à diminuição da produção de proteínas como ciclina D, ciclina E, CDK2, CDK4 e CDK6 encarregadas da progressão das células na fase G0-G1 ou proteínas como Rb (retinoblastoma) responsáveis da progressão da fase G0-G1 e S (CHEN, 2004).

A morte por apoptose a diferença da necrose celular acontece de uma forma organizada, detectando-se mudanças morfológicas onde a membrana celular não se destrói. Durante o processo de apoptose não se produz inflamação, já que as células fagocitárias reconhecem, localizam e eliminam os corpos apoptóticos. Quando a célula fisiologicamente está predestinada à morte, diversos sinais desencadeiam a apoptose (lesões no DNA, infecções virais ou danos irreparáveis), ativando-se o programa

genético que conduz a rotura do DNA e a degradação de proteínas. (DEGTEREV, 2008).

Desse jeito se considera uma vantagem que os extratos estudados tenham induzido as Jurkat a apoptose e não a necrose já que por este ultimo mecanismo ocorre uma deterioração letal das estruturas celulares, paralisando-se as funções vitais da célula; a perda da viabilidade depende da ruptura da membrana plasmática e consequente lise celular sendo um mecanismo totalmente agressivo. A liberação do conteúdo celular provoca diferentes reações inflamatórias, cuja característica principal é o dano letal na célula. (IRACHETA, 2007)

7 CONCLUSÃO

- A concentração máxima de DMSO para utilização em culturas de células Jurkat e PBMC, por 24h, 48h ou 72h não pode exceder 1% v/v.

- Todos os extratos avaliados nesse estudo apresentaram efeito citotóxico sobre a linhagem tumoral Jurkat, no entanto, os mais tóxicos foram os extratos etanólicos da *M. ferruginata* e *A. fastigiatum* e os extratos aquosos da *Miconia ferruginata*. O tratamento com o extrato de *A. fastigiatum* a 50ug/mL por 24h apresentou a maior citotoxicidade seletiva, bem como eficácia, quando comparado aos outros extratos avaliados.

- Todos os extratos vegetais avaliados (PBf, Mfet, Mfaq e Afpa) interferiram no ciclo celular das células Jurkat. O tratamento por 24 horas com os extratos promoveu uma retenção das células na fase G2M.

- Apoptose foi o principal mecanismo de morte envolvido citotoxicidade dos extratos sobre as células Jurkat.

8 BIBLIOGRAFIA

- ABBRUZZESE, L.; AGOSTINI, F.; DURANTE, C.; TOFFOLA, R. T.; RUPOLO, M.; ROSSI, F. M.; LLESHI, A.; ZANOLIN, S.; MICHIELI, M.; MAZZUCATO, M. Long term cryopreservation in 5% DMSO maintains unchanged CD34(+) cells viability and allows satisfactory hematological engraftment after peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sanguinis*, v. 105, n. 1, p. 77-80, 2013.
- ALBUQUERQUE MELLO, M.O.; COSTA, C.F.; BARBOSA, M.M.S. Catálogo de plantas tóxicas e medicinais do Estado da Bahia. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, V.10, n.1, p.39-65, 1971.
- ALMEIDA, A. Geographical distribution of Eupatorieae (Asteraceae) in southeastern and south Brazilian mountain ranges. *Plant Ecology*, Netherlands, v. 174, p. 163-181. 2004.
- ALMEIDA, V. Composição química e efeito sobre mediadores inflamatórios de preparações de partes aéreas de *Pseudobrickellia brasiliensis* (spreng) r. m. king & h. rob (arnica-do-campo) *in vitro*. 2015. 139f. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas)- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.
- ALMEIDA, V. Efeito citotóxico e potencial anti-inflamatório de *Pseudobrickellia brasiliensis* (spreng) r. m. king & h. rob (arnica-do-campo) em Células Mononucleares do Sangue Periférico humano, *in vitro*. 2012. 74f. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas)- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2012.
- ALMEIDA, V. S.; BANDEIRA, F. F. The cultural significance of use of caatinga plants by Quilombolas of the Raso Catarina, Jeremoabo district, Bahia, Brazil. *Rodriguésia*, v. 61, n. 2, p. 195-209, 2010.
- AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, Rio Claro, v.34, p.1-20, 2011.
- AMIEL, E.; OFIR, R.; DUDAI, N.; SOLOWAY, E.; RABINSKY, T.; RACHMILEVITCH, S. β -Caryophyllene, a Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell Lines. *Evid Based Complement Alternat Med*, p.8, 2012.
- AMOROZO, M.C.M. Algumas notas adicionais sobre o emprego de plantas e produtos com fins terapêuticos pela população cabocla do município de Barcarena, PA, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica*, V.13, n.2, p.191-213, 1997.
- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, V.16, n.2, p.189-203, 2002.
- ARAÚJO, E. L.; RANDAU, K. P.; SENA-FILHO, J. G.; PIMENTEL, R. M. M.; XAVIER, H. S. *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectives for a phytotherapeutic product. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 18, p. 777-784, 2008.

ATCC. Disponível em: <http://www.atcc.org/About/WhoWeAre/tabid/139/Default.aspx/>. Disponível em: Acesso em: 9 jan. 2016.

AVELAR-FREITAS, B. A. Análise da composição química, atividade citotóxica e inibição de citocinas *in vitro* de preparações de partes aéreas da planta *Ageratum fastigiatum*. 105 f. Tese (Doutorado pelo curso Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013b.

AVELAR-FREITAS, B.A.; ALMEIDA, V.G.; PINTO, M.C.X.; MOURÃO, F.A.G.; MASSENSINI, A.R.; MARTINS-FILHO, O.A.; ROCHA-VIEIRA, E.; BRITO-MELO, G.E.A. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.47, p.307-315, 2014.

BACKES, P.; IRGANG, B. Árvores do Sul: guia de identificação & interesse ecológico. As principais espécies nativas sul brasileiras. Porto Alegre: Instituto Souza Cruz, 2002. 325 p.

BAKER, J. G. Compositae I Vernoniaceae. In: Martius, C. F. P. von & Eichler, A. W. (eds.). Flora brasiliensis, v. 6, p. 1-179, 1873.

BAKER, J. G. Compositae II Eupatoriaceae. In: Martius, C. F. P. von & Eichler, A. W. (eds.). Flora brasiliensis, v. 6, p.181-374, 1876.

BAKER, J. G. Compositae III Asteroideae, Inuloideae. In: Martius, C. F. P. von & Eichler, A. W. (eds.). Flora brasiliensis v. 6, p. 1-134, 1882.

BAKER, J. G. Compositae IV Helianthoideae, Mutisiaceae. In: Martius, C. F. P. von & Eichler, A. W. (eds.). Flora brasiliensis v. 6, p. 138-398, 1884.

BARLOGIE, B.; SPITZER, G.; HART, J. DNA histogram analysis of human hematopoietic cells. *Blood*, v. 48, p. 245-258, 1976.

BARROSO, G.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F. & H. C. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa, Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, v. 3, p. 326, 1986.

BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO, A. G.; AZEVEDO JUNIOR, W. F.; MOREIRA, I. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; ASTOLFI FILHO, S. A.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p.475-506, 2005.

BAUMGRATZ, J. et al. Melastomataceae – Lista de espécies da flora do Brasil. 2014. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: Acesso em: 15 Junho 2016.

BAYALA, B.; BASSOLE, I.; SCIFO, R.; GNOULA, C.; MOREL, L.; LOBACCARO J.; SIMPORE, J. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *American Journal of Cancer Research*, v.4, p. 591-607, 2014.

BERG, M.E. Plantas medicinais na Amazônia. Contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2ª ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993. 207 p.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro in vivo antitumor effect of 5- FU combined with piplartine and piperine*. *J. appl. Toxicol.*, v. 28. P. 156-663, 2008.

BOHLMANN, F., AHMED, M., KING, R. M., ROBINSON, H. Labdane and eudesmane derivatives from *Ageratum fastigiatum*. *Phytochemistry*, v. 20, p. 1434-1435, 1981.

BOHLMANN, F., LUDWIG, G. W., JAKUPOVIC, J., KING, R. M., ROBINSON, H. A. Daucanolide further farnesene derivatives from *Ageratum fastigiatum*. *Phytochemistry*, v. 22, p. 983-986, 1983.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.; ROBINSON, H. Hydroxygermacrene and other constituents from *Pseudobrickellia brasiliensis*. *Phytochemistry*, v.23, n.8, p.1798-9, 1984.

BONO, R.; SIMON, V. Citometría de flujo: Principios básicos y aplicaciones. En *Fundamentos de Inmunología*. Palomo I, Ferreira A, Sepúlveda C, Roseblatt M, Vergara U. Ed. Universidad de Talca 1998, p. 647-65.

BOONCLARM, D.; SORNWATANA, T.; ARTHAN, D.; KONGSAEREE, P.; SVASTI, J. Beta-Glucosidase catalyzing specific hydrolisis of an iridoid beta-glucoside from *Plumeria obtusa*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 38, n.8, p. 563-570, 2006.

BOSCOLO, O.H. Estudos Etnobotânicos do Município de Quissamã R.J. 2003. 206 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Botânica) - Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BRITO-MELO G. E.; PERUHYPE-MAGALHAES V.; TEIXEIRA-CARVALHO A.; BARBOSA-STANCIOLI E. F.; CARNEIRO-PROIETTI A. B.; CATALAN-SOARES B.; RIBAS J. G.; MARTINS-FILHO O. A. IL-10 produced by CD4+ and CD8+ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 147, n. 1, p. 35-44, 2006.

BRUNING, M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 17, p. 2675-2685, 2012.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal and Biological Research*, v. 33, p. 179-189, 2000a.

CARVALHO, M.G.; SILVA, M.B.S. Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação. Belo Horizonte, 1988. 139p.

CARVALHO, P. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Embrapa/CNPQ, 1994. 640 p.

CHEN, W.J.; LIN, K. Induction of G1 arrest and apoptosis in human jurkat T cells by pentagalloylglucose through inhibiting proteasome activity and elevating p27Kip1, p21Cip1/WAF1, and Bax proteins. J Biol Chem, 2004. 279(14): p. 13496-505.

CONNOLLY, J.D.; HILL, R.A. Triterpenoids. Natural Product Reports, v.25, p.794-830, 2008.

COSTA, E.; MENEZES, L.R.; ROCHA, S.L.; BALIZA, I.R.; DIAS, R.B.; ROCHA, C.A.; SOARES, M.B.; BEZERRA, D.P. Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of *Zornia brasiliensis*. Planta méd, v. 81, p. 563-567, 2015.

COSTA, L. Efeito do extrato etanólico de *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob. de e de sua fração sobre a produção citocinas e proliferação de linfócitos humanos, *in vitro*. 105 f. Tese (Mestrado pelo curso Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M.T H.; ATHER, A.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. J. Ethnopharmacol., v. 99, p 21-30, 2005.

COWAN, M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Miami, p. 564-82, oct.1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. Expert. Opin. Investig. Drugs. v. 9, p. 1-15, 2000.

CRUZ, A. M.; KAPLAN, M. C. Uso Medicinal de Espécies das Famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. Revista de Floresta e Ambiente, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

DAHAMA, S, TABANAA, Y.; LOIY, A.; MOHAMED, K.; AMAN, M.; AMIN, M. In vitro antimetastatic activity of Agarwood (*Aquilaria crassna*) essential oils against pancreatic cancer cells. Alexandria Journal of Medicine, v.52, p. 141–150, 2016.

DEAN, P.N.; JETT, J.H. Mathematical analysis of DNA distributions from flow microfluorometry. J Cell Biol, v.60, p. 523-527, 1974.

DEGTEREV, A., YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. Nat Rev Mol Cell Biol, v. 9, p.378-390, 2008.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V.; MIRANDA, M. A.; SENNA-VALLE, L.; KAPLAN, M. A. C. Analgesic and Anti-inflammatory Properties of essential Oil from *Ageratum fastigiatum*. Brazilian Archives of Biology Technology, v.52, n.5, p. 1115-1121, 2009b.

- DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V.; YAMAMOTO, C. H.; KAPLAN, M. A. C. Atividades antinociceptiva e antimicrobiana de *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob. (Asteraceae). Fitomedicina medicinal Rev. Bras. Farm, v.88, n. 4, p. 181- 184, 2007.
- DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V.; YAMAMOTO, C. H.; KAPLAN, M. A. C. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). Records of Natural Products, v. 3, n. 1, p. 52-57, 2009a.
- DOMINGUES, C.; FELFILI, J. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. Acta botânica Brasílica, São Paulo, v.20, n. 1, p. 135-142, 2006.
- ELUJOBA, A; ODELEYE, O; OGUNYEMI, C. Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, v. 2, n.1, p.46-61, 2005.
- FORMAN, S.; KAS, J.; FINI, F.; STEINBERG, M.; RUMML, T. The effect of different solvents on the ATP/ADP content and growth properties of HeLa cells. J Biochem Mol Toxicol, v.13, p.11-15,1999.
- FORZZA, R.C. et al. 2010. Catálogos de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Andrea Jakobsson Estúdio, Rio de Janeiro. 871p.
- FOX, MH. A Model for the Computer Analysis of Synchronous DNA Distribution. Cytometry, v 1, p.71-77, 1980.
- FRESHNEY, IR. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. 5 ed. New York: Wiley- Liss; 2005.
- FRICKER, S.; BUCKLEY, R. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity end points for an in vitro screen for antitumour agents. Anticancer Res, v.16, p. 3755-3760, 1996.
- GALLO, M.; SARACHINE, M. Biological activities of Lupeol. International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, 2009.
- GOLDENBERG, R. Melastomataceae: Miconia Ruiz & Pav. In: MARTINS, S. E.; WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM, T. S. (Eds.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. v. 06. São Paulo-SP: Instituto de Botânica, FAPESP, 2009.
- GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; SOUZA, M. L. R. Taxonomy of Melastomataceae in Brazil: retrospective and perspective views, and an identification key for the genera. Rodriguésia, v. 63, n. 1, p.145-61, 2012.
- GOLDENBERG, R.; CADDAGH, M. Taxonomic notes on South American Miconia (Melastomataceae) III. Phytotaxa, v. 94, n. 1, p. 13-22, 2013.
- GORDON, M; DAVID, J. Plants as a source of anti-cancer agents. Journal of Ethnopharmacology, v.100, 2005.

GRAY, J.; DOLBEARE, F.; PALLAVICINI, M. Quantitative cell-cycle analysis. En: Flow Cytometry and Sorting. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.

GUERITTE, F.; FAHY, J. The vinca alkaloids. In Anticancer Agents from Natural Products, edited by Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Chapter, v.7, 2005.

GUIMARÃES, A.; ARAÚJO, G.; FERNANDES, G. Estrutura fitossociológica em área natural e antropizada de uma vereda de Uberlândia, MG. Acta Bot Bras, v.16, p. 317-329, 2002.

GUIZARDI, F.; PINHEIRO, R. Novas práticas sociais na constituição do direito à saúde: a experiência de um movimento fitoterápico comunitário. Interface Comunicação saúde Educação, v. 12, p.109-122. 2008.

HADRI, A.; GÓMEZ, M.; SANZ, J.; GONZÁLEZ, A.; IDAOMAR, M.; RIBAS B.; BENEDÍ, J.; SÁNCHEZ, M. Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, v.76, p. 343-356, 2010.

HAMBURGER, M; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry, v.30, p. 3864-3874, 1991.

HAMILTON, A.; SHENGJI, P.; KESSY, J.; KHAN, A.A.; LAGOS-WITTE, S. & SHINWARI, Z.K. The purposes and teaching of Applied Ethnobotany. Godalming, People and Plants working paper, Godalming, UK, p. 76, mar. 2003.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WAHLBERG, P.; WENNERBERG, J.; KJELLSTRÖM, JH. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill *in vitro* between colorimetric and cell count/colony assays. ***In vitro Cellular & Developmental Biology - Animal***, v.42, n.10, p.320-323, 2006.

HIND, D. J. N. Notes on the Compositae of Bahia, Brasil. Kew Bulletin, Kew, v. 48, n. 2, p. 245-277, 1993.

HOLMES, W. C. A proposed sectional classification for Mikania (Eupatorieae). In: Hind, D. J. N. & Beentje, H. J. (eds.). Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, v. 1, p. 621-626, 1996.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; Lee, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. Methods, v. 42, n.4, p.377-387, 2007.

HOWARD, C.; STEVENS, J.; IZEVBIGIE, E. B.; WALKER, A.; McDANIEL, O. Time and dose-dependent modulation of phase 1 and phase 2 gene expression in response to 73 treatment of MCF-7 cells with a natural anti-cancer agent. Cell and Molecular Biology, v.49, n.7, p.1057-1065, 2003.

IGNACIMUTHU, S; AYYANAR, M; SIVARAMAN, S. Ethnobotanical investigations among tribes in Madurai district of Tamil Nadu (India). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 2, n. 1, p.7, 2006.

IRACHETA, M. El suicidio y la muerte celular. *Real Academia de Ciencias Exactas*, v. 101, n. 2, p. 1-33, 2007.

JI, J.; ZHANG, L.; WU, YY.; ZHU, XY.; LV, SQ.; SUN, XZ. Induction of apoptosis by d-limonene is mediated by a caspase-dependent mitochondrial death pathway in human leukemia cells. *Journal Leukemia & Lymphoma*, v.47, p. 2617-24, 2006

JIA, S.; XI, G.; ZHANG, M.; CHEN, Y.; LEI, B.; DONG, X.; YANG, Y. Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. *Oncology Reports*, v. 29, p. 349-354, 2012.

KINGSTON, D. Taxol and its analogs. In *Anticancer Agents from Natural Products*, edited by Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Chapter, v. 6, 2005.

KYONG-SUK, J.; MIN-JI, B.; MIRA, J.; LIM, W.; JOWOO-SIK, J. α -pinene triggers oxidative stress and related signaling pathways in A549 and HepG2 cells. *Food Science and Biotechnology*, v.19, p.1325-1332, 2010.

LEE, SC.; SIM, N.; CLEMENT, MV.; YADAV, SK.; PERVAIZ, S. Dominant negative Rac1 attenuates paclitaxel-induced apoptosis in human melanoma cells through upregulation of heat shock protein 27: a functional proteomic analysis. *Proteomics*, v. 7, p. 4112 – 122, 2007.

LEGAULT, J.; DAHL, W.; DEBITON, E, PICHETTE, A.; MADELMONT, J. Antitumor Activity of Balsam Fir Oil: Production of Reactive Oxygen Species Induced by α -Humulene as Possible Mechanism of Action. *Planta Médica*, v.69, p.402-407, 2003.

LEWIS W; ELVIN-LEWIS M. Medicinal plants as sources of new therapeutics. *Ann Missouri Bot Gard*, Estados Unidos, p. 16-24, 1995.

LIEBERMAN, M, PATTERSON, G. In vitro bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other parameters on growth inhibitory activity, v. 173: 21-29, 2001.

LIMA, L. A. R.; SANTOS, D. L.; FERREIRA, H. D.; TRESVENZOL, L. F.; PAULA, J. R.; FIUZA, T. S. Prospecção Fitoquímica e Determinação do Teor de Umidade das Folhas de *Miconia ferruginata* DC. (Melastomataceae). *Revista de Biotecnologia & Ciência (CFBC)*, v. 2, n. 1, p. 1, 2013.

LOIZZO, MR.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; SAAB, AM.; STATTI, GA.; MENICHINI, F. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. *International Journal of Cancer Research and Treatment*, v.27, p.3293-3300, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 544 p.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Jr. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAM, M.; PINTO, AC.; VEIGA, Jr VF.; GRYNBERG, NF.; ECHEVARRIA, A. (2000). Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. *Quim Nova*, v. 25, p.429-38, 2002.

MAMEDOV, Medicinal Plants Studies: History, Challenges and Prospective. Omics Publishing Groups, United States, p.1, 2012.

MARODIN, S.M.; BAPTISTA, L.R.M. O Uso de plantas com fins medicinais no município de Dom Pedro de Alcântara, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, v.4, n.1, p.57-68, 2001.

MARTINS, A. B.; SEMIR, J.; GOLDENBERG, R.; MARTINS, E. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) no estado de São Paulo. *Acta Botânica Brasílica*, v. 10, n. 2, p. 267-316, 1996.

MELAMED, M.; MULLANEY, P.; SHAPIRO, H. An historical review of the development of flow cytometers and sorters. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.

MELLO, A.; COELHO, M. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil, v. 11, n.1, p. 47 - 52, 2004.

MENDONÇA, R.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JÚNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S. & NOGUEIRA, P.E.N. Flora vascular do Cerrado. In: *S. Sano & S. Planaltina*. p. 287-55, 1998.

MENEZES, N. L.; GIULIETTI, A. M. Campos rupestres. In: MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. (Ed.). *Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas; Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, p. 65-73, 2000.

MILES, H.; KOKPOL, U. Tumor inhibitors II: Constituents and antitumor activity of *sarracenia flava*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.65, p. 284-285, 1976.

MILES, H.; KOKPOL, U.; ZALKOW, L.; STEINDEL, S.; NABORS, J. Tumor inhibitors I: Preliminary investigation of antitumor activity of *Sarracenia flava*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.63, p. 613-615, 1974.

MONACHE, F. Tópicos en Productos Naturales para el Desarrollo de Nuevas Drogas. En: CONGRESO DE FITOPATOLOGÍA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SACRO, CENTRO CLÍNICA DEL RETORI (CNR), 1997, Roma. Resumo Roma: Universidad Católica de Sacro de Roma, 1997.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v.83, n.11, p.757-766, 1991.

MORIARITY, DM.; HUANG, J.; YANCEY, CA.; ZHANG, P.; SETZER, WN.; LAWTON, RO.; BATES, RB.; CALDERA, S. Lupeol is the cytotoxic principle in the leaf extract of *Dendropanax cf. querceti*. *Planta médica*, v.64, p.370-372, 1998.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T., PEREIRA, N.A. *Medicinal Plants of Brazil*. 1ª ed. Michigan, USA: Reference Publications, 2000. 501 p.

MURTAZA, I.; SALEEM, M.; ADHAMI, V.; HAFEEZ, B.; MUKHTAR, H. Suppression of cFLIP by Lupeol, a Dietary Triterpene, Is Sufficient to Overcome Resistance to TRAIL-Mediated Apoptosis in Chemoresistant Human Pancreatic Cancer Cells. *HHS Public Access*, v. 69, p. 1156–1165, 2009.

NAKAJIMA, J. A família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. 467 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

OLIVEIRA, F. Triagem da atividade antitumoral e antimicrobiana de plantas nativas do Cerrado da região de Diamantina Vale do Jequitinhonha/Minas Gerais. 31 f. Tese (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

PEREIRA, R. C. A. Revisão taxonômica do gênero *Ichthyothere* Mart. (Heleiantheae – Asteraceae). 2001. 223 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2001.

PIVA, M.G. O caminho das plantas medicinais - Estudo etnobotânico. 1ªed. Rio de Janeiro: Mondrian, 2002. 313 p.

PRAKASH, O. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. *American Journal of Pharmacological Sciences*, v.1, n. 6, p. 104-115, 2013.

PRASAD, S.; NIGAM, N.; KALRA, N.; SHUKLA, Y. Regulation of signaling pathways involved in lupeol induced inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, v.47, p. 916–924, 2008.

RABITNOVICH, P. Practical Considerations for DNA Content Cell Cycle Analysis. In: *Clinical Flow Cytometry: Principles Applications*. Bauer Ketel (eds), W and W, Baltimore, 1993; p. 117-42.

REBECA, A, M.A., ISHII-IWAMOTO, E.L., GRESPAN, R., CUMAN, R.K., CAPARROZASSEF, S.M., MELLO, J.C., BERSANI-AMADO, C.A. Toxicological studies on *Stryphodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, n. 1-2, p. 101-4, 2002.

- RENNER, S. S. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nordic Journal of Botany*, v. 13, p. 519-40, 1993.
- RENNER, S. S.; TRIEBEL, D.; ALMEDA, F.; STONE, D.; ULLOA, C. U.; MICHELANGELI, F. A.; GOLDBERG, R.; CIFUENTES, H. M. Melastomataceae.net. Disponível em <www.melastomataceae.net>. Acesso em 8 Janeiro 2016.
- REZENDE, A. R.; ROMERO, R.; GOLDBERG, R. Synopsis of *Miconia* section *Miconia* DC. (Melastomataceae) in the state of Minas Gerais, Brazil. *Bioscience Journal*, v. 30, n. 1, p. 273-87, 2014.
- RIBEIRO, J. F.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; MENDONÇA, R. C.; FILGUEIRAS, T. S.; SILVA, M. R. Caracterização Florística e Potencial de Uso das Espécies Vasculares Ocorrentes nas Fazendas Trijunção, BA – Documentos, v.46. 1.ed. Planaltina, DF: Publicação Embrapa Cerrados, 2001. 48p.
- RIBEIRO, P. Fitoquímica e atividades biológicas de *Miconia ferruginata* DC. (Melastomataceae). 255 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, v.1, n. 3, p. 4, 2006.
- ROMERO, R.; MARTINS, A. B. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 25, n.1, p.19-24, 2002.
- SAJJADI, SE.; JAMALI, M.; SHOKOOHINIA, Y.; ABDI, G.; SHAHBAZI, B.; FATTAHI, A. Antiproliferative evaluation of terpenoids and terpenoid coumarins from *Ferulago macrocarpa* (Fenzl) Boiss. *Fruits*, v.4, p. 322-328, 2015.
- SALMINENA, A.; LEHTONEN, M.; SUURONEN, T.; KAARNIRANTAD, K.; HUUSKONEN, J. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.65, p. 2979 – 2999, 2008.
- SANTOS, J. Avaliação do potencial anti-inflamatório de frações do extrato etanólico de folhas de *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R. M. King & H. Rob (Arnica-do-campo) (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.
- SANTOS, N. C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical pharmacology*, v. 65, n. 7, p. 1035–1041, 2003.
- SCHENKEL, E. P. As plantas medicinais, os chás e os fitoterápicos. In: *Cuidado com os medicamentos*, Porto Alegre, Saga/De luzzata Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 103-106, 1991.

SCHNEIDER, U; SCHWENK, H; BORNKAMM, G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, v. 19, p. 621-6, 1977.

SILVA, C.; SIMEONI, L .; SILVEIRA, Dâmaris. Genus Pouteria: Chemistry and biological activity. *Journal of Pharmacognosy, Brazilian*, p. 501-509, 2009.

SILVA, R.; REZENDE, C. M.; PEREIRA, J. B.; VIEIRA, R. F.; SANTOS, M e BIZZO H. Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from *Pseudobrickellia brasiliensis* (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research*, v.27, n.5, p.417-20, 2015.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, JT.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, MR. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. *Journal of The National Cancer Institute*, v.82, p. 1107-112, 1990.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 704 p. 2008.

STALCUP, M. M. Plantas de uso medicinal ou ritual numa feira livre no Rio de Janeiro, Brasil. 2000. 212 f. Tese (Mestrado em Botânica). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012. Disponível em: < <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Disponível em: Acesso em: 9 jan. 2016.

TAVARES, W. S.; GRAEL, C. F. F.; MENEZES, C. W. G.; CRUZ, I.; SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, J.C. Residual effect of extracts of native plants from Brazil and a synthetic insecticide, chlorpyrifos, on *Coleomegilla maculata*, *Cycloneda sanguinea*, and *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Vie et milieu*, v. 62, n. 3, p. 115-120, 2012.

TENNANT, J.R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*, v.2, p.685-694, 1964.

TOMLINSON T. R., AKERELE O. Medicinal plants: their role in health and biodiversity. University of Pennsylvania Press, Philadelphia, 1998. 240p.

VEGA, E; VELAZCO, R; JIMENEZ, M. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Revisión*, v.31, n. 3, p. 97-111, 2006.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

VENOM, J. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, São Paulo, p. 402-413, 2010.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, v. 184, n. 95, p. 39-51, 1995.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, V.3, n.1, p.13-26, 2000.

VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*, Mendoza, v. 18, p. 87-115, 2009.

WATSON, J; CHAMBERS, SH; SMITH, PJ. A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry*, v.8, p.1-8,1987.

WHO (World Health Organization). The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. 12p.


WILLIAMS, R. B.; NORRIS, A.; SLEBODNICK, C.; MEROLA, J.; MILLER, J. S.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia pachyclada* from the Madagascar rainforest 1. *Journal of Natural Products*, v.68, n.9, p.1371-1374, 2005.

XAVIER, R.M. et al. Laboratórios na prática clínica – consulta rápida. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 928p.

ZHANG, X.; WANG, L.; LIU, DW.; TANG.; G.; ZHANG.; H. Synergistic inhibitory effect of berberine and d-limonene on human gastric carcinoma cell line MGC803. *Journal of Medicinal Food*, v.17, p. 955–962, 2014.

ZHANG, Z.; GUO, S.; LIU, X1.; GAO, X. Synergistic antitumor effect of α -pinene and β -pinene with paclitaxel against non-small-cell lung carcinoma (NSCLC). *Drug Res (Stuttg)*, v.65, p.214-218, 2015.

ANEXO A- Autorização de acesso ao patrimônio genético

	Número do Processo: 010832/2014-9 Nome: Helen Rodrigues Martins Data Envio: 10/11/2014 18:21:35 Sector: COAPG/DABS CA: 68	
	IDENTIFICAÇÃO - PROJETO	
	NÚMERO DO PROCESSO 010832/2014-9	LINHA DE FOMENTO/CHAMADA Patrimônio Genético / Autorização de Acesso ao PG (Pesquisa Científica)
	COMITÊ ASSESSOR 68 - PROGRAMA DE BIODIVERSIDADE ÁREA DE CONHECIMENTO Farmacognosia MODALIDADE CONTRATAÇÃO Individual	
CA DE JULGAMENTO 68 - PROGRAMA DE BIODIVERSIDADE		
DADOS DO SOLICITANTE		
PROPONENTE Helen Rodrigues Martins	CPF [REDACTED]	TITULAÇÃO MÁXIMA Doutorado
DATA DE NASCIMENTO 19/01/1977	SEXO Feminino	E-MAIL helen.rmartins@gmail.com
END RESIDENCIAL Rua Valmira Pires, 143 - Apto 03 - Diamantina MG	TELEFONE RESIDENCIAL 38 - 88374599	NACIONALIDADE Brasileiro
FAX [REDACTED]		
INSTITUIÇÃO PROPONENTE UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - Campus JK (Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000 Diamantina) reitoria@ufvjm.edu.br		
ÁREA DE ATUAÇÃO DO PROPONENTE - Ciências Biológicas/Protozoologia de Parasitos - Ciências Biológicas/Biologia Molecular - Ciências Biológicas/Genética Molecular e de Microorganismos		
INSTITUIÇÕES - PROJETO		
FUNÇÃO Acesso da Amostra	NOME UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - Campus JK	
Executora/Sede	UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - Campus JK	
Parceria/Cooperação	UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo	
Vínculo Institucional	UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - Campus JK	
DADOS GERAIS - PROJETO		
TÍTULO Caracterização química avaliação do potencial biológico de Plantas Nativas da Região de Diamantina ? MG (Vale do Jequitinhonha)		
SIGLA 01/01/2015	DATA DE INÍCIO	DURAÇÃO 36 mês(es)
PALAVRAS CHAVE perfil químico; cerrado; plantas; atividade biológica;		HOME PAGE DO PROJETO
RESUMO NÃO SIGILOSO Entre os vários estratégias disponíveis para a descoberta de novas drogas, mais efetivas, menos tóxicas e seletivas, avaliação de plantas (medicinais ou não) é uma estratégia bastante promissora		

ANEXO B- Autorização para coleta do material botânico *Pseudobrickellia brasiliensis*



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 35605-1	Data da Emissão: 02/09/2013 13:14
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: VALÉRIA GOMES DE ALMEIDA	CPF: [REDACTED]
--------------------------------	-----------------

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em cavema.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPÉCIE	<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 15799955



Página 1/1

ANEXO C- Autorização para coleta do material botânico *Miconia ferruginata*

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 29793-4	Data da Emissão: 28/03/2012 18:22
Dados do titular	
Nome: Luiz Elídio Gregorio	CPF: 267.891.418-63

Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
ESPECIE	Remijia ferruginea, Diospyros burchellii, Himatanthus spp., Hirtella glandulosa, Jacaranda micrantha, Marlierea spp., Kielmeyera rubriflora, Lfoensia vandelliana, Miconia ferruginata, Myrcia tomentosa, Eriotheca pentaphylla, Croton antispylliticus, Paepalanthus ruficeps, Qualea dichotoma, Agonandra brasiliensis, Callisthene minor, Paepalanthus trichopetalus, Paepalanthus polygonus, Vochysia elliptica, Schefflera macrocarpa, Agarista deifolia, Chrysophyllum marginatum, Pseudobombax longiflorum, Pera glabrata
FAMILIA	Primulaceae, Eriocaulaceae, Rubiaceae, Sapindaceae, Amaranthaceae, Asteraceae
GENERO	Gomphrena, Guapira, Byrsonima, Chomelia, Norantea, Enterolobium, Ageratum

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 25622829



Página 1/1

ANEXO D- Autorização para coleta do material botânico *Ageratum fastigiatum*

Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 26221-1		Data da Emissão: 11/11/2010 14:19
Dados do titular		
Registro no Ibama: 5141848	Nome: Bethânia Alves de Avelar	CPF: [REDACTED]

Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, sejam integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.	
2	A autorização não exime o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.	
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.	
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.	
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que a Decreto-Lai nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 6.066/1966 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.	
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.	6
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.	18 21
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.	18 19 20
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.	
	realizada a atividade	
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que a Decreto-Lai nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 6.066/1966 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.	
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.	
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.	
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.	
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.	

ANEXO E- Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de esclarecimento Projeto de pesquisa

Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos vegetais de *Pseudobrickellia brasiliensis* (spreng) r. m. king & h. rob, *Miconia ferruginata* DC e *Ageratum fastigiatum* (gardn.) r. m. king sobre células tumorais jurkat.

O objetivo do presente estudo é caracterizar a atividade citotóxica das plantas *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Miconia ferruginata* e *Ageratum fastigiatum* para o qual você foi escolhido por ter entre 20 e 39 anos, não ter doenças como catapora, lúpus, diabetes, alergia, e não fazer uso regular de anti-inflamatórios. Sua participação no estudo consistirá em doar 15mL de sangue, que será coletado por punção venosa com tubos a vácuo (da mesma maneira que é coletado quando você faz algum exame de sangue), em data e horário a combinar. A partir do sangue serão obtidos os leucócitos para os experimentos em laboratório. Os riscos de sua participação incluem hematoma (roxo no local da coleta de sangue), dor, tontura, enjôo e de contaminação. A coleta será feita por pessoa treinada, em local limpo e reservado, equipado com maca, utilizando material estéril e descartável. Os seus dados serão mantidos em sigilo e sua identidade não será revelada. Só os pesquisadores envolvidos no projeto terão acesso aos dados, que serão utilizados apenas para fins de pesquisa e divulgação científica em congressos, livros e revistas. Não está prevista qualquer forma de remuneração pela sua participação no estudo e você não terá nenhuma despesa (portanto, não está previsto nenhuma forma de ressarcimento). Quaisquer dúvidas que possam surgir durante o andamento deste estudo por parte do voluntário poderão ser esclarecidas junto aos membros da equipe responsáveis pelo projeto, pessoalmente ou por telefone. Você poderá recusar e/ou deixar de participar deste estudo a qualquer momento, sem nenhum constrangimento ou prejuízo na sua relação com os pesquisadores e a UFVJM. Os pesquisadores responsáveis por este projeto podem decidir sobre a sua exclusão do estudo por razões científicas, a respeito das quais você deverá ser devidamente informado. Em caso de qualquer dúvida deverá e/ou poderá entrar em contato a qualquer hora com o pesquisadora responsável María Angélica Mera Córdoba (angelicamc55@gmail.com) ou telefone (38) 988177479. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – UFVJM (38) 35326060 para informações sobre a aprovação do projeto pelo comitê.

Termo de livre consentimento pós-informado

Eu discuti os riscos e benefícios da minha participação no estudo intitulado “**Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos vegetais de *Pseudobrickellia brasiliensis* (spreng) r. m. king & h. rob, *Miconia ferruginata* DC e *Ageratum fastigiatum* (garn.) r. m. king sobre células tumorais jurkat.**” com os pesquisadores envolvidos. Eu li e compreendi todos os procedimentos que envolvem esta pesquisa e tive tempo suficiente para considerar a minha participação no estudo. Eu perguntei e obtive as respostas para todas as minhas dúvidas. Eu sei que posso me recusar a participar deste estudo ou que posso abandoná-lo a qualquer momento sem qualquer constrangimento ou prejuízo. Eu também compreendo que os pesquisadores podem decidir a minha exclusão do estudo por razões científicas, sobre as quais eu serei devidamente informado. Não terei nenhuma remuneração e nenhum gasto por participar do projeto. Tenho uma cópia deste formulário, o qual foi assinado em duas vias idênticas e rubricadas.

Portanto, aqui forneço o meu consentimento para participar do estudo intitulado

Eu discuti os riscos e benefícios da minha participação no estudo intitulado “Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos vegetais de *Pseudobrickellia brasiliensis* (spreng) r. m. king & h. rob, *Miconia ferruginata* DC e *Ageratum fastigiatum* (garn.) r. m. king sobre células tumorais jurkat.

Diamantina, _____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário: _____

Testemunha: _____

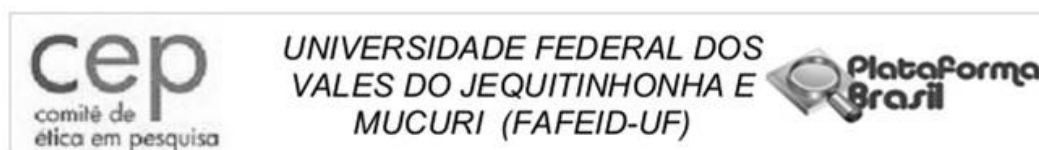
Testemunha: _____

Declaro que expliquei todos os objetivos, benefícios e riscos deste estudo ao voluntário, dentro dos limites de meus conhecimentos científicos.

Pesquisador responsável:
 Maria Angélica Mera C
 angelicamc55@gmail.com
 (38) 988177479

Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM
 Campus JK – Rodovia MGT 367 – Km 583 – nº 5000 – Alto da Jacuba
 CEP: 39.100-000 Diamantina - MG
 Coordenação: Profa. Dra. Thais Peixoto Gaiad Machado
 Vice-coordenação: Profa. Dra. Rosamary Aparecida Garcia Stuchi
 Secretária: Dione Conceição de Paula
 Telefone: (38) 3532-1240/3532-1200
 E-mail: cep@ufvjm.edu.br

ANEXO F- Comprovante de registro no CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: *ELABORAÇÃO DE EXTRATOTECA E BANCO DE DADOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS A PARTIR DE PLANTAS NATIVAS DA REGIÃO DE DIAMANTINA MG (VALE DO JEQUITINHONHA)*

Pesquisador: *Bethânia Alves de Avelar Freitas*

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 28665514.2.0000.5108

Instituição Proponente: *Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri*

Patrocinador Principal: *Financiamento Próprio*

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.018.204

Data da Relatoria: 28/04/2015

Apresentação do Projeto:

A região de Diamantina está localizada na região central do estado de Minas Gerais, dentro do bioma Cerrado, com diferentes fitofisionomias, sendo a mais marcante e com maior extensão os campos rupestres. A região, apresenta importância biológica especial, por apresentar grande e diversificada riqueza botânica com elevado grau de endemismo. É possível que muitas dessas plantas apresentem atividades biológicas. Assim, o presente estudo irá avaliar composição química e atividades biológicas de plantas da região de Diamantina, a fim de construir uma biblioteca com informações sobre os diferentes extratos vegetais.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar uma triagem fitoquímica e de atividades biológicas imunomodulatórias de plantas nativas da região de Diamantina-MG.

Objetivo Secundário:

- Coletar e identificar plantas nativas da região de Diamantina com base nos dados de localização presentes em exsicatas do herbário da instituição, priorizando as espécies não suficientemente estudadas. - Construir uma extratoteca (coleção de extratos), com obtenção e análise química de

Endereço: *Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000*

Bairro: *Alto da Jacuba*

CEP: 39.100-000

UF: *MG*

Município: *DIAMANTINA*

Telefone: (38)3532-1240

Fax: (38)3532-1200

E-mail: *cep@ufvjm.edu.br*